

**Appressorienbildung von *Ustilago maydis*  
auf hydrophoben Oberflächen:  
Regulation durch Membranproteine**



**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Daniel Lanver**  
aus Osnabrück

Marburg/Lahn, 2011



Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von November 2007 bis Februar 2011 unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen durchgeführt.

Vom Fachbereich  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: 28.06.2011

Erstgutachter:	Frau Prof. Dr. Regine Kahmann
Zweitgutachter:	Herr Prof. Dr. Michael Bölker
Drittgutachter:	Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2011

Teile dieser Arbeit werden/wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Fernández-Álvarez, A., Marín-Menguiano, M., Lanver, D., Reissmann, S., Pérez-Pulido, A.J., Kahmann, R., und Ibeas, J.I.** (2011) In silico genomic analysis of *Ustilago maydis* reveals Pmt4 target proteins required for virulence. (in Arbeit)

**Lanver, D., Mendoza-Mendoza, A., Brachmann, A., und Kahmann, R.** (2010). Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22**, 2085-2101.

Weitere Veröffentlichungen:

**Freitag, J.\*, Lanver, D.\*, Böhmer, C., Schink, K.O., Bölker, M., und Sandrock, B.** (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressorium formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* (im Druck)

\* zu gleichen Teilen beigetragen

**Berndt, P., Lanver, D., und Kahmann, R.** (2010). The AGC Ser/Thr kinase Aga1 is essential for appressorium formation and maintenance of the actin cytoskeleton in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **78**, 1484-1499.



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Appressorienbildung von *Ustilago maydis* auf hydrophoben Oberflächen: Regulation durch Membranproteine“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 15.04.2011

Daniel Lanver

*Überall geht ein frühes Ahnen dem späten Wissen voraus*

Alexander von Humboldt (1769 - 1859)

## Zusammenfassung

*Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Die pathogene Entwicklung wird durch Fusion kompatibler Zellen und der Bildung eines dikaryotischen Filaments initiiert. Auf der Pflanzenoberfläche bildet *U. maydis* Appressorien aus, die das Eindringen des Pilzes in die Pflanze ermöglichen. Die Appressorienbildung wird durch die Hydrophobizität der Blattoberfläche und Cutin Monomere stimuliert. Die pathogene Entwicklung von *U. maydis* wird durch eine konservierte, zum FG (*filamentous growth*)-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae* homologe, MAP-Kinase Kaskade gesteuert. In Hefe agieren zwei Plasmamembranproteine, Sho1p und Msb2p, an der Spitze des MAP-Kinase Signalwegs.

In dieser Arbeit wurden Sho1- und Msb2-verwandte Proteine in *U. maydis* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Sho1 und Msb2 essentiell für die Virulenz von *U. maydis* sind. Genetische Analysen ergaben, dass Sho1 und Msb2 oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Kaskade agieren. Für Sho1 wurde zudem gezeigt, dass es die MAP-Kinase Kpp6 destabilisiert, indem es direkt mit der N-terminalen Domäne von Kpp6 interagiert. Dies dient wahrscheinlich der Feinregulation der Kpp6 Aktivität.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Sho1 und Msb2 spezifisch die Appressorienbildung regulieren, aber für die Zellfusion sowie filamentöses Wachstum nicht benötigt werden. Ferner waren *sho1* und *msb2* Mutanten während der morphologischen Differenzierung auf hydrophoben Oberflächen eingeschränkt, während die Reaktion auf Cutin Monomere nicht beeinträchtigt war. Dies deutet darauf hin, dass Sho1 und Msb2, die beide in der Plasmamembran lokalisieren, bei der Perzeption von Oberflächen beteiligt sind. Msb2, welches zur Familie der Transmembranmucine gehört, wird in ein zelluläres und ein extrazelluläres Fragment prozessiert. Beide Proteindomänen werden für die Funktion von Msb2 benötigt. Da die hoch glycosylierte extrazelluläre Domäne an die Umgebung abgegeben wird, werden zusätzliche Funktionen von Msb2 in der extrazellulären Matrix vermutet, wie z.B. die Vermittlung der Adhäsion zwischen Filamenten und Oberflächen.

Transkriptomanalysen unter Appressorien-induzierenden *in vitro* Bedingungen zeigten, dass Sho1 und Msb2 notwendig für die Expression von potentiell sekretierten Zellwand-degradierenden Enzymen sind. Ferner wurden sekretierte Effektoren, die essentiell für die biotrophe Interaktion von *U. maydis* mit seiner Wirtspflanze sind, in Abhängigkeit von Sho1 und Msb2 exprimiert. Dies zeigt, dass *U. maydis* durch Sho1 und Msb2 auf die biotrophe Entwicklung vorbereitet wird, noch während die Hyphen auf der Pflanzenoberfläche wachsen. Da Sho1 und Msb2 in phytopathogenen Pilzen konservierte Proteine sind, könnten sie generelle Virulenzfaktoren darstellen.

## Summary

*Ustilago maydis* is the causative agent of corn smut disease. Pathogenic development is initiated by fusion of compatible cells and the formation of a filamentous dikaryon. On the plant surface *U. maydis* differentiates appressoria enabling the fungus to penetrate the plant epidermis. Appressorium formation is stimulated by the hydrophobicity of the leaf surface and cutin monomers. Pathogenic development of *U. maydis* is regulated by a conserved MAP-kinase cascade homologues to the FG (filamentous growth)-pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. In yeast, two transmembrane proteins, Sho1p and Msb2p, act at the head of this MAP-kinase cascade.

In this study Sho1 and Msb2-related proteins in *U. maydis* were characterized. It could be shown that Sho1 and Msb2 are essential for virulence of *U. maydis*. Genetic data provided evidence that Sho1 and Msb2 act upstream of the pathogenicity-relevant MAP-kinase cascade. Furthermore, Sho1 was shown to destabilize the MAP-kinase Kpp6 through direct interaction with the unique N-terminal domain in Kpp6, indicating a role of Sho1 in fine-tuning Kpp6 activity.

It could be demonstrated that Sho1 and Msb2 specifically regulate appressorium formation and are neither required for cell fusion nor for filamentous growth. Moreover, *sho1* and *msb2* mutants were affected in their morphological response to hydrophobic surfaces, but responded normally to cutin monomers. This suggests that Sho1 and Msb2, which localize in the plasma membrane, are involved in surface perception. The Msb2 protein, which belongs to the family of transmembrane mucins, is processed into a cellular and an extracellular fragment. Both domains are essential for function of Msb2. Since the highly glycosylated extracellular domain is shed to the environment, additional roles of Msb2 in the extracellular matrix are assumed, i.e. mediation of adhesion between filaments and surfaces.

Transcriptional profiling under appressorium inducing *in vitro* conditions revealed that Sho1 and Msb2 are necessary for the expression of potential secreted cell wall degrading enzymes. Furthermore, secreted effectors, known to be essential for the biotrophic interaction between *U. maydis* and its host plant, were found to be Sho1 and Msb2 dependently expressed. This indicates that Sho1 and Msb2 prime *U. maydis* for biotrophic development when hyphae are growing on the plant surface. Since Sho1 and Msb2 are conserved proteins in phytopathogenic fungi, they could represent general virulence factors.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

aa	„amino acid(s)“	kb	Kilobasenpaar(e)
Abb.	Abbildung	kD	Kilodalton
bp	Basenpaar(e)	MAP(K)	„mitogen-activated protein (kinase)“
BSA	„bovine serum albumin“	MAPKK	MAPK-Kinase
bzw.	beziehungsweise	min	Minute(n)
cAMP	„cyclic adenosine monophosphate“	n.s	nicht signifikant
Cbx	Carboxin	Nat	Nourseothricin
cDNA	„complementary“ DNA	N-terminal	aminoterminal
CM	„complete medium“	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
con	konstitutiv	ORF	„open reading frame“
C-terminal	carboxyterminal	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CW	Calcofluor white	PAMP	„Pathogen-associated molecular pattern“
CWDE(s)	„cell wall degrading enzyme(s)“	PCR	„polymerase chain reaction“
Δ	Deletion	PI	Propidium Iodid
d.h.	das heißt	ppi	Peptidylprolyl Isomerase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PRD	Prolinreiche Domäne
DIC	„differential interference contrast“	qPCR	quantitative „real-time“ PCR
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
ECM	„extracellular matrix“	s	Sekunde(n)
FG	„filamentous growth“	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	SH3	SRC Homology 3
GFP	„green fluorescent protein“	SLAD	„synthetic low ammonium dextrose“
ggf.	gegebenenfalls	STR	Serin/Threonin-reich
GTP	Guanosin-Triphosphat	Tab.	Tabelle
h	Stunden(n)	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	U	Unit (Enzymaktivität)
HA	Hämagglutinin	Upm	Umdrehungen pro Minute
HOG	„high osmolarity glycerol“	vgl.	vergleiche
HPS	16-Hydroxy-Palmitinsäure	WGA	„wheat germ agglutinin“
Hyg	Hygromycin	wt	Wildtyp
ip	„iron-sulphur protein“	z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE .....</b>	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Infektionsstrukturen phytopathogener Pilze .....	1
1.2 Signale und Signalwahrnehmung für die Appressorienbildung .....	2
1.3 Sho1- und Msb2-abhängige Signalwege in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.4 Der Maisbeulenbrandpilz <i>Ustilago maydis</i> .....	7
1.4.1 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	8
1.4.2 Das regulatorische <i>b</i> -Netzwerk .....	10
1.4.3 Die MAP-Kinase Signalkaskade.....	12
1.5 Fragestellung .....	13
<b>2 ERGEBNISSE.....</b>	<b>14</b>
2.1 Domänenarchitektur von Sho1 und Msb2 aus <i>U. maydis</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	14
2.2 Sho1 und Msb2 aus <i>U. maydis</i> und <i>S. cerevisiae</i> sind keine funktionellen Homologe .....	15
2.3 Sho1 und Msb2 lokalisieren in der Cytoplasmamembran .....	16
2.4 Die Rolle von Sho1 und Msb2 während des saprophytischem Wachstums und der Paarungsreaktion .....	18
2.4.1 Die Reaktion auf umweltbedingten Stress wird durch Sho1 und Msb2 nicht beeinflusst ...	19
2.4.2 Die Paarungskompetenz ist unabhängig von Sho1 und Msb2 .....	20
2.5 Der Einfluss von Sho1 und Msb2 auf die pathogene Entwicklung von <i>U. maydis</i> .....	21
2.5.1 Sho1 und Msb2 werden für die Pathogenität benötigt .....	21
2.5.2 <i>sho1</i> und <i>msb2</i> Mutanten sind in der Kolonisation des Pflanzengewebes eingeschränkt....	23
2.5.3 Die <i>sho1/msb2</i> Doppelmutante induziert nach Infektion eine Pflanzenabwehr.....	25
2.6 Die Funktion von Sho1 und Msb2 während der Bildung von Infektionsstrukturen.....	26
2.6.1 Sho1 und Msb2 werden für die Appressorienbildung benötigt.....	27
2.6.2 Appressorien von <i>sho1</i> und <i>msb2</i> Einzeldelentionsmutanten penetrieren die Pflanzenoberfläche mit leicht verminderter Effizienz.....	29

2.6.3 Die Differenzierung von <i>sho1</i> und <i>msb2</i> Mutanten auf hydrophoben Oberflächen ist eingeschränkt .....	30
2.6.4 Sho1 und Msb2 werden für die Reaktion auf Hydroxy-Fettsäuren nicht benötigt .....	32
2.6.5 Sho1 und Msb2 Proteine akkumulieren in Appressorien.....	33
2.7 Sho1 und Msb2 wirken oberhalb der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6.....	34
2.7.1 Die Deletion von <i>rok1</i> supprimiert den Virulenzdefekt von SG200Δ <i>sho1</i> Δ <i>msb2</i> .....	34
2.7.2 Expression von <i>fuz7DD</i> supprimiert den Penetrationsdefekt von SG200Δ <i>sho1</i> Δ <i>msb2</i> .....	35
2.8 Die Interaktion von Sho1 mit der MAP-Kinase Kpp6 .....	37
2.8.1 Sho1 interagiert spezifisch mit Kpp6.....	37
2.8.2 Identifizierung der Interaktionsdomänen von Sho1 und Kpp6 .....	39
2.8.3 Auswirkung der Sho1/Kpp6 Interaktion auf die pathogene Entwicklung .....	40
2.9 Transkriptomanalysen von <i>sho1</i> und <i>msb2</i> Mutanten .....	43
2.9.1 Deletionen von <i>sho1</i> und <i>msb2</i> haben ähnliche Auswirkungen auf die Genexpression .....	43
2.9.2 <i>sho1</i> und <i>msb2</i> werden für die Expression sekretierter Effektoren benötigt.....	44
2.10 Prozessierung und Sekretion von Msb2 .....	48
2.10.1 Msb2 wird prozessiert und sekretiert.....	48
2.10.2 Die intra- und extrazelluläre Domäne von Msb2 werden für die Funktion des Proteins benötigt .....	51
<b>3 DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
3.1 Sho1 und Msb2 sind an der morphologischen Differenzierung auf Oberflächen beteiligt .....	55
3.2 Viele sekretierte CWDEs und Effektoren werden Sho1- und Msb2-abhängig exprimiert.....	56
3.3 <i>sho1/msb2</i> Doppelmutanten induzieren pflanzlichen Zelltod .....	59
3.4 Sho1 und Msb2 agieren oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Kaskade und greifen in die <i>b</i> -Kaskade ein.....	59
3.5 Gemeinsame und unterschiedliche Funktionen von Sho1 und Msb2 in <i>U. maydis</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	63
3.5.1 Sho1 interagiert mit einer negativ regulatorischen Domäne von Kpp6 .....	65
3.5.2 Posttranslationelle Modifikationen von Msb2 beeinflussen seine Funktion.....	66
3.5.3 Ist Msb2 ein Sensor für Oberflächensignale? .....	69
3.6 Sho1 und Msb2 sind konservierte Pathogenitätsfaktoren in phytopathogenen Pilzen .....	71
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>73</b>
4.1 Material und Bezugsquellen .....	73
4.1.1 Chemikalien .....	73
4.1.2 Puffer und Lösungen.....	73
4.1.3 Enzyme und Antikörper.....	73

4.1.4	Verwendete Kits.....	74
4.2	Zellkultivierung .....	74
4.2.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	74
4.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	74
4.2.3	Kultivierung von <i>U. maydis</i> .....	75
4.2.4	Bestimmung der Zelldichte.....	77
4.3	Stämme, Oligonukleotide und Plasmide.....	77
4.3.1	<i>E.coli</i> Stämme .....	77
4.3.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme .....	77
4.3.3	<i>U. maydis</i> Stämme .....	78
4.3.4	Oligonukleotide.....	80
4.3.5	Plasmide.....	84
4.4	Mikrobiologische Methoden.....	90
4.4.1	Induktion von Filamenten und Appressorien <i>in vitro</i> .....	90
4.4.2	Infektion von <i>Z. mays</i> mit <i>U. maydis</i> .....	91
4.4.3	Transformation.....	92
4.5	Molekularbiologische Methoden.....	95
4.5.1	<i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren .....	95
4.5.2	Isolierung von Nukleinsäuren .....	96
4.5.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	99
4.5.4	Transkriptomanalysen.....	102
4.6	Biochemische Methoden .....	105
4.6.1	Gewinnung von Proteinextrakten.....	105
4.6.2	Co-Immunpräzipitation.....	106
4.6.3	Auftrennung und Nachweis von Proteinen .....	108
4.7	Färbungen und Mikroskopie.....	111
4.7.1	Färbemethoden.....	111
4.7.2	Immunfluoreszenz.....	112
4.7.3	Mikroskopie und Bildverarbeitung .....	113
4.8	Bioinformatische Methoden .....	114
<b>5</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>131</b>



# 1 Einleitung

Das Eindringen von phytopathogenen Pilzen in das Gewebe der Wirtspflanze ist ein entscheidender Schritt bei der Entstehung von Pflanzenkrankheiten. Die erste Barriere, mit der Pathogene vor der Infektion konfrontiert werden, ist die pflanzliche Cuticula, die alle oberirdischen Pflanzenteile umgibt. Viele phytopathogene Pilze sind in der Lage diese Barriere aktiv zu durchbrechen, was die pilzliche Entwicklung im Pflanzengewebe ermöglicht. Eine Strategie fast aller phytopathogenen Pilze ist die Ausbildung spezieller Infektionsstrukturen, die eine starke Adhäsion an die Pflanzenoberfläche vermitteln und Ausgangspunkt für die Bildung von Penetrationshyphen sind (Emmett und Parbery, 1975). In *Colletotrichum* und *Fusicladium* Spezies wurden solche Infektionsstrukturen von dem deutschen Botaniker A. B. Frank (1883) erstmals entdeckt, der daraufhin den Begriff „Appressorium“ (Adhäsionsorgan) prägte.

## 1.1 Infektionsstrukturen phytopathogener Pilze

Die Morphologie von Appressorien ist mannigfaltig, zeichnet sich jedoch stets durch eine geschwollene Filamentspitze aus, die in Form und Größe zwischen verschiedenen Spezies stark variiert (Howard, 1997). Anhand der Morphologie und dem Penetrationsmechanismus lassen sich im Wesentlichen zwei Arten von Appressorien unterscheiden. Zum einen werden große, melanisierte und damit deutlich erkennbare Infektionsstrukturen gebildet. Der Reisbranderreger *Magnaporthe grisea* bzw. *Magnaporthe oryzae* und das Mais Pathogen *Colletotrichum graminicola* sind typische Vertreter dieser Appressorienform (Mendgen und Deising, 1993). Die Penetration erfolgt hier hauptsächlich über mechanischen Druck, wobei über eine intrazelluläre Glycerin Akkumulation ein enormer Zellturgor aufgebaut wird, der stark genug ist, die Pflanzenoberfläche zu durchbohren (De Jong *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1991; Bechinger *et al.*, 1999). Die Melanisierung der Appressorienwand ist hierfür von essentieller Bedeutung, da sie als Barriere für osmotisch aktive Moleküle wirkt (Howard *et al.*, 1991; Kubo und Furosawa, 1991).

Auf der anderen Seite bilden viele phytopathogene Pilze nicht-melanisierte, unscheinbare Infektionsstrukturen aus, wie beispielsweise der necrotrophe Erreger der Grauschimmelfäule *Botrytis cinerea*, oder die biotrophen Brandpilze (Emmett und

Parbery, 1975; Staples, 1985). Der Penetrationsmechanismus dieser Appressorien ist weniger gut verstanden, beruht aber höchstwahrscheinlich auf der Aktivität von sekretierten Zellwand-degradierenden Enzymen (CWDEs), die am Penetrationsort durch einen lokalen Abbau der Cuticula und Pflanzenzellwand invasives Wachstum der Pilzhyphe in die Pflanzenzelle erlauben (Deising *et al.*, 2000). In *Cochliobolus carbonum* und *Fusarium oxysporum* führt die Deletion von *snf1*, einem zentralen Regulator der Katabolitrepression, zu einer drastisch reduzierten Virulenz, die auf eine verminderte Ausschüttung von CWDEs zurückzuführen ist (Tonukari *et al.*, 2000; Ospina-Giraldo *et al.*, 2003). Desweiteren konnten Pektatlyasen, Endopolygalacturonasen, Xylanasen und Lipasen als Pathogenitätsfaktoren in phytopathogenen Pilzen identifiziert werden (Rogers *et al.*, 2000; ten Have *et al.*, 1998; Kars *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 2000; Giesbert *et al.*, 1998; Commenil *et al.*, 1998; Berto *et al.*, 1999). Ob die beobachteten Virulenzdefekte solcher Mutanten aus einer verminderten Penetrationseffizienz resultieren bleibt jedoch weitestgehend offen, da Penetrationseffizienz nicht direkt getestet wurde und andere Funktionen von CWDEs, wie z.B. die Nährstoffversorgung während des Wachstums innerhalb der Pflanze, anzunehmen sind (Deising *et al.*, 2000).

## 1.2 Signale und Signalwahrnehmung für die Appressorienbildung

Schon bei der Entdeckung von pilzlichen Infektionsstrukturen beobachtete Frank (1883), dass sich Appressorien von *Colletotrichum lindemuthianum* ausschließlich auf der Pflanzenoberfläche bildeten, während auf einer Glasoberfläche lediglich die Bildung eines Keimschlauchs induziert wurde. Inzwischen wurde eine Vielzahl von Pflanzensignalen identifiziert, die in phytopathogenen Pilzen Appressorienbildung induzieren. Zum einen werden physikalische Signale wahrgenommen, wie z.B. die Härte, Hydrophobizität und Topographie der Oberfläche, andererseits spielen chemische Signale, darunter Ethylen, epikutikuläre Wachse und Cutin Monomere, eine entscheidende Rolle (Tucker und Talbot, 2001 und darin enthaltene Referenzen). Häufig entscheidet die Kombination aus verschiedenen Stimuli über den Grad der Differenzierung. In *M. grisea* reicht eine hydrophobe Oberfläche zwar aus, um Appressorienbildung zu induzieren (Lee und Dean, 1993), eine hydrophile Oberfläche kann jedoch ebenfalls induktiv sein, wenn gleichzeitig das Wachs 1,16-Hexadecandiol appliziert wird (Gilbert *et al.*, 1996). In dem Brandpilz *Ustilago maydis* werden Appressorien ausschließlich auf hydrophoben Oberflächen gebildet, wobei die Zugabe von Cutin Monomeren einen stark stimulierenden Effekt hat

(Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). In *Uromyces appendiculatus*, einem Rostpilz, der seine Wirtspflanze über Stomata penetriert, wird neben einer hydrophoben Oberfläche die topographische Erhebung der Schließzellen als Signal für die Appressorienbildung wahrgenommen (Wynn *et al.*, 1976; Hoch *et al.*, 1987; Terhune und Hoch, 1993). Ein gemeinsames Signal, das alle phytopathogenen Pilze für die Appressorienbildung benötigen, ist der Kontakt zu einer Oberfläche. Die Wahrnehmung dieses Signals kann damit als Grundvoraussetzung für die Bildung von Infektionsstrukturen angesehen werden (Tucker und Talbot, 2001).

Zwischen Oberfläche und Infektionshyphye besteht kein direkter Kontakt. Der Zwischenraum wird durch eine glycoproteinreiche extrazelluläre Matrix (ECM) ausgefüllt, die die Hyphye vollständig umgibt (Mims und Richardson, 1989; Brown und Howard, 1994; Pain *et al.*, 1996). Die extrazelluläre Matrix ist verantwortlich für die starke Adhäsion zwischen Pilzhyphe und Pflanzenoberfläche, spielt vermutlich bei der Wahrnehmung der Oberflächensignale eine entscheidende Rolle und ist essentiell für eine erfolgreiche Infektion (Nicholson und Epstein, 1991; Epstein und Nicholson, 1997). Ein proteolytischer ECM Abbau verringert die adhäsiven Eigenschaften von Infektionshyphen, was mit einer reduzierten Appressorienbildung einhergeht (Epstein *et al.*, 1985, 1987; Xiao *et al.*, 1994). In den letzten Jahren wurden diverse ECM Proteine identifiziert, die eine Funktion bei der Appressorienbildung haben und deren Funktion für die Oberflächenperzeption diskutiert wurde (Talbot *et al.*, 1996; Beckermann und Ebbale, 1996; Kamakura *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Skamnioti und Gurr, 2007). Die Übertragung von extrazellulären Oberflächensignalen zu intrazellulären Signalkaskaden erfolgt jedoch höchstwahrscheinlich über Plasmamembranproteine (Deising *et al.*, 2000; Kumamoto, 2008). Im Folgenden sind die derzeitigen Kenntnisse über solche Rezeptoren zusammengefasst.

In *U. appendiculatus* wurde eine Beteiligung von mechanosensitiven (MS)-Ionenkanälen an der Appressorienbildung nachgewiesen. Zhou *et al.* (1991) konnten zeigen, dass der Kontakt zwischen *U. appendiculatus* Filamenten und einer Appressorien-induzierenden Oberflächenerhebung MS-Ionenkanäle aktiviert. Eine Inhibition dieser Ionenkanäle inhibiert auch die Appressorienbildung. Es wird daher angenommen, dass eine auf der Änderung der Wachstumsrichtung beruhende Membranperturbation zu einer Öffnung von MS-Ionenkanälen führt und dadurch appressorielle Differenzierung initiiert wird (Kumamoto, 2008).

In tierischen Zellen können Adhäsions-vermittelte, mechanische Kräfte über glycosylierte Transmembranproteine, sogenannte Integrine, wahrgenommen werden. Die Bindung von Integrinen an proteinogene ECM Komponenten außerhalb der Zelle und Komponenten des Aktincytoskeletts innerhalb der Zelle ermöglicht eine Übertragung von extrazellulär wirkenden Kräften in das Zellinnere (Bershadsky *et al.*, 2003). Integrine besitzen eine hohe Affinität zur Tripeptid Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD), die in vielen ECM Proteinen enthalten ist. Eine interessante Entdeckung war, dass RGD Peptide inhibitorisch auf die Appressorienbildung von *U. appendiculatus* und *M. grisea* wirken (Correa *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 2007). In phytopathogenen Pilzen könnten also Integrin-ähnliche Proteine an der Oberflächenwahrnehmung und Signalweiterleitung beteiligt sein (Correa *et al.*, 1996; Deising *et al.*, 2000).

In *M. grisea* führt die Deletion von *PTH11* zu einer drastisch verminderten Appressorienbildung auf induktiven Oberflächen (DeZwaan *et al.*, 1999). *PTH11* codiert für ein Plasmamembranprotein, das einer neuen Klasse von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) angehört und oberhalb der cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*)-Signalkaskade wirkt (DeZwaan *et al.*, 1999; Kulkarni *et al.*, 2005). Zu Beginn dieser Arbeit stellte Pth11p den einzigen bis dahin charakterisierten potentiellen Rezeptor dar, der Oberflächensignale bei Appressorienbildung in das Zellinnere übertragen könnte.

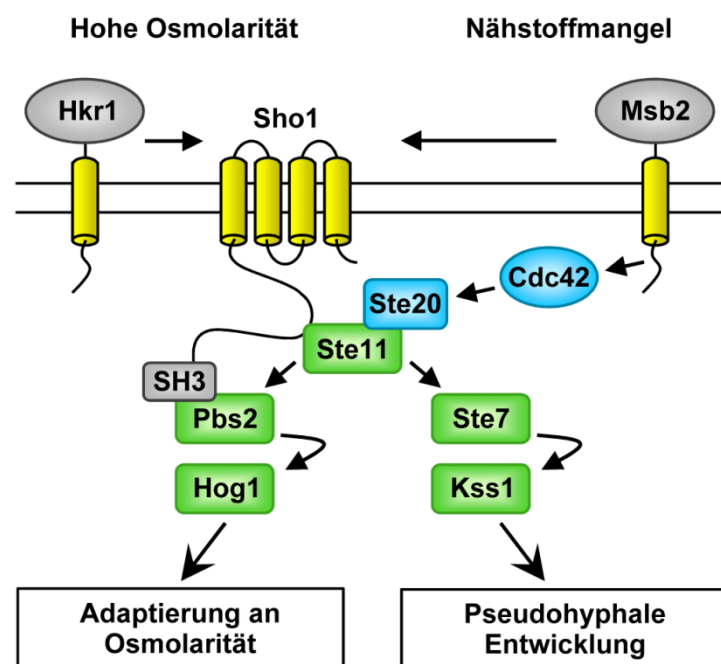
Im Gegensatz zu den geringen Kenntnissen über die Rezeptoren, die Oberflächensignale wahrnehmen, konnten intrazelluläre Signalwege, die Appressorienbildung regulieren, in vielen phytopathogenen Pilzen identifiziert werden (Tucker und Talbot, 2001). In *U. maydis*, *B. cinerea* und *Magnaporthe* Spezies sind z.B. cAMP- als auch MAP (*mitogen-activated protein kinase*)-Kinase Signalkaskaden für die Appressorienbildung nötig (Regenfelder *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2003b; Zheng *et al.*, 2000; Doehlemann *et al.*, 2006; Lee und Dean, 1993; Mitchel und Dean, 1995; Choi und Dean, 1997; Liu und Dean, 1997; Xu und Hamer, 1996; Zhao *et al.*, 2005). Ferner wurde eine Beteiligung von MAP-Kinasen an der Appressorienbildung von *Cochliolobus heterostrophus*, *Pyrenophora teres*, *Colletotrichum lagenarium* und *Claviceps purpurea*, bzw. dem invasiven Wachstum von *F. oxysporum* gezeigt (Lev *et al.*, 1999; Ruiz-Roldan *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2000; Mey *et al.*, 2002; Di Pietro *et al.*, 2001).

Da die intrazelluläre Verarbeitung von Appressorien-induzierenden Signalen über konservierte Signalkaskaden erfolgt (Xu, 2000; Borges-Walmsley und Walmsley, 2000), könnten auch die Rezeptoren, die solche Signale wahrnehmen, in anderen Organismen konserviert sein. In diesem Zusammenhang könnte die Bäckerhefe *Saccharomyces*

*cerevisiae* hilfreich sein, da in diesem saprophytischen Pilz bereits viele Plasmamembranproteine identifiziert wurden, die potentielle Sensoren für Umweltsignale sind (Chen und Thorner, 2007). Im Folgenden werden Signalwege aus *S. cerevisiae* näher beschrieben, die durch die Plasmamembranproteine Sho1p und Msb2p reguliert werden.

### 1.3 Sho1- und Msb2-abhängige Signalwege in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Reaktion auf umweltbedingten Stress wird in *S. cerevisiae* über komplexe Netzwerke gesteuert, an denen MAP-Kinase Kaskaden maßgeblich beteiligt sind. Bei Nährstoffmangel reagiert *S. cerevisiae* mit der Bildung von Pseudohyphen, einer unipolaren Wachstumsform, die vermutlich der Erschließung neuer Nahrungsquellen dient (Gimeno *et al.*, 1992; Roberts und Fink, 1994; Kron *et al.*, 1994). Bei osmotischem Stress wird durch eine schnelle Synthese kompatibler Solute der Zellturgor aufrecht gehalten und so das Überleben gesichert (Blomberg und Adler, 1992; Hohmann, 2002).



**Abb. 1:** In *S. cerevisiae* stehen Sho1p und Msb2p an der Spitze von MAP-Kinase Signalkaskaden. Sho1p und Msb2p wirken im HOG- und FG-Signalweg. Hkr1p wirkt spezifisch im HOG-Signalweg. Bei osmotischem Stress wird die MAP-Kinase Hog1p aktiviert. Bei Nährstoffmangelbedingungen wird die MAP-Kinase Kss1p aktiviert. Nähere Informationen finden sich im Text. Pfeile geben Interaktionen an. Membranproteine sind gelb und Komponenten der MAP-Kinase Module grün dargestellt. Die kleine GTPase Cdc42p und die PAK Ste20p sind in blauer Farbe gekennzeichnet.

In beiden Prozessen ist die Aktivierung von MAP-Kinasen notwendig (Abb. 1). Während im FG (*filamentous growth*)-Signalweg die MAP-Kinase Kss1p den Übergang zu pseudohyphalem Wachstum einleitet (Liu *et al.*, 1993; Roberts und Fink, 1994; Cook *et al.*, 1997; Madhani *et al.*, 1997), ist im HOG (*high osmolarity glycerol*)-Signalweg die MAP-Kinase Hog1p essentiell für die osmotische Adaptierung (Boguslawski, 1992). An der Aktivierung der MAP-Kinasen sind das Plasmamembranprotein Sho1p sowie die Transmembranmucine Msb2p und Hkr1p beteiligt (Abb. 1). Während Hkr1p an der Spitze des HOG-Signalwegs steht und für den FG-Signalweg nicht relevant ist (Tatebayashi *et al.*, 2007; Pitoniak *et al.*, 2009), agiert Sho1p oberhalb von beiden Signalwegen (Maeda *et al.*, 1995; Cullen *et al.*, 2000). Msb2p ist essentiell für den FG-Signalweg und hat mit Hkr1p partiell redundante Funktionen im HOG-Signalweg (Cullen *et al.*, 2004; O'Rourke und Herskowitz, 2002; Tatebayashi *et al.*, 2007). Da sowohl Msb2p als auch Hkr1p mit Sho1p interagieren können (Cullen *et al.*, 2004; Tatebayashi *et al.*, 2007), wird vermutet, dass während des pseudohyphalen Wachstums Sho1/Msb2 Komplexe gebildet werden und während der osmotischen Adaptierung Sho1/Hkr1 Komplexe entstehen (Abb. 1; Cullen *et al.*, 2004; Tatebayashi *et al.*, 2007; Pitoniak *et al.*, 2009). Diese Komplexe könnten die Kapazität besitzen, die jeweiligen Stimuli wahrzunehmen und auf die entsprechende MAP-Kinase Kaskade zu übertragen.

Die MAP-Kinase Kaskade im HOG-Signalweg besteht aus der MAPKK-Kinase Ste11p (Posas und Saito, 1997), der MAPK-Kinase Pbs2p (Boguslawski, 1992) und der MAP-Kinase Hog1p (Brewster *et al.*, 1993). Während der Aktivierung des HOG-Signalwegs hat Sho1p die Funktion eines Gerüstproteins. Bei osmotischem Stress wird Pbs2p durch eine hoch affine Bindung zwischen dem prolinreichen Erkennungsmotiv in Pbs2p und der SH3-Domäne von Sho1p an die Membran rekrutiert (Abb. 1; Maeda *et al.*, 1995; Raitt *et al.*, 2000; Reiser *et al.*, 2000). Eine Domäne im cytoplasmatischen C-Terminus von Sho1p stellt eine zusätzliche Bindung mit Ste11p her (Zarrinpar *et al.*, 2004). Durch diese Konstellation, kann ausgehend von der PAK (*p21-activated kinase*) Ste20p, eine Phosphorylierungskaskade erfolgen, die letztlich zur Aktivierung von Hog1p führt (Abb. 1; Maeda *et al.*, 1995; Drogen *et al.*, 2000; Raitt *et al.*, 2000; Reiser *et al.*, 2000; Tatebayashi *et al.*, 2006).

Die Kernkomponenten der MAP-Kinase Kaskade im FG-Signalwegs sind Ste11p, die MAPK-Kinase Ste7p und die MAP-Kinase Kss1p (Abb. 1; Liu *et al.*, 1993; Roberts und Fink, 1994). Für Msb2p konnte eine Interaktion mit der kleinen GTPase Cdc42p nachgewiesen werden (Cullen *et al.*, 2004). Da Cdc42p im FG-Signalweg mit Ste20p

assoziiert ist (Mösch *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 1996; Leberer *et al.*, 1997), wird angenommen, dass Msb2p extrazelluläre Signale über Cdc42p und Ste20p auf das MAP-Kinase Modul überträgt (Abb. 1; Cullen *et al.*, 2004). Die genaue Funktion von Sho1p während der Aktivierung von Kss1p ist nicht bekannt, es ist jedoch ebenfalls eine Rekrutierung von Signalmolekülen an die Plasmamembran denkbar, da die Funktion von Msb2p im FG-Signalweg abhängig von Sho1p ist (Cullen *et al.*, 2004).

Transmembranmucine wie Msb2 und Hkr1 sowie das Transmembranprotein Sho1 sind in Pilzen hoch konservierte Proteine (Krantz *et al.*, 2006), die auch in *Aspergillus fumigatus* und *Candida* Spezies für die Reaktion auf umweltbedingten Stress benötigt werden (Boisnard *et al.*, 2008; Roman *et al.*, 2005, 2009; Norice *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2008). Die Bedeutung dieser Proteine für phytopathogene Pilze war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt.

#### 1.4 Der Maisbeulenbrandpilz *Ustilago maydis*

Die biotrophen Rost- und Brandpilze sind ökonomisch bedeutsame Pflanzenschädlinge. Letztere infizieren mit Gräsern und Getreiden wichtige Kulturpflanzen und verursachen weltweit immense wirtschaftliche Schäden (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002). Der Heterobasidiomycet *U. maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes, einer Krankheit, die



**Abb. 2: Symptome des Maisbeulenbrandes.** Nach Infektion von *Zea mays* mit *U. maydis* bilden sich Tumore, die der Pflanze ein verbranntes Aussehen geben. Foto aufgenommen von R. Rösser (September 2009) im Umland von Marburg.

sich in allen oberirdischen Pflanzenteilen ausprägt und deren Hauptmerkmal die Ausbildung großer Tumore ist (Abb. 2; Christensen, 1963). Innerhalb dieser Tumore werden schwarz pigmentierte Teliosporen gebildet, die den befallenen Pflanzen ein verbranntes Aussehen geben und für den Namen der Erkrankung, als auch des Erregers (lat. *ustilare* = verbrennen) verantwortlich sind.

Im Gegensatz insbesondere zu Rostpilzen zeichnet sich *U. maydis* durch seine Kultivierbarkeit unter axenischen Bedingungen und seine gute genetische sowie revers genetische Zugänglichkeit aus.

Zudem besitzt *U. maydis* einen sehr kurzen Lebenszyklus, der unter Gewächsbedingungen innerhalb von zwei bis drei Wochen vollendet wird. Diese Eigenschaften, in Verbindung mit dem vollständig entschlüsselten Genom (Kämper *et al.*, 2006), machen *U. maydis* zu einem exzellenten Modellorganismus für phytopathogene Pilze (Kahmann und Kämper, 2004; Brefort *et al.*, 2009).

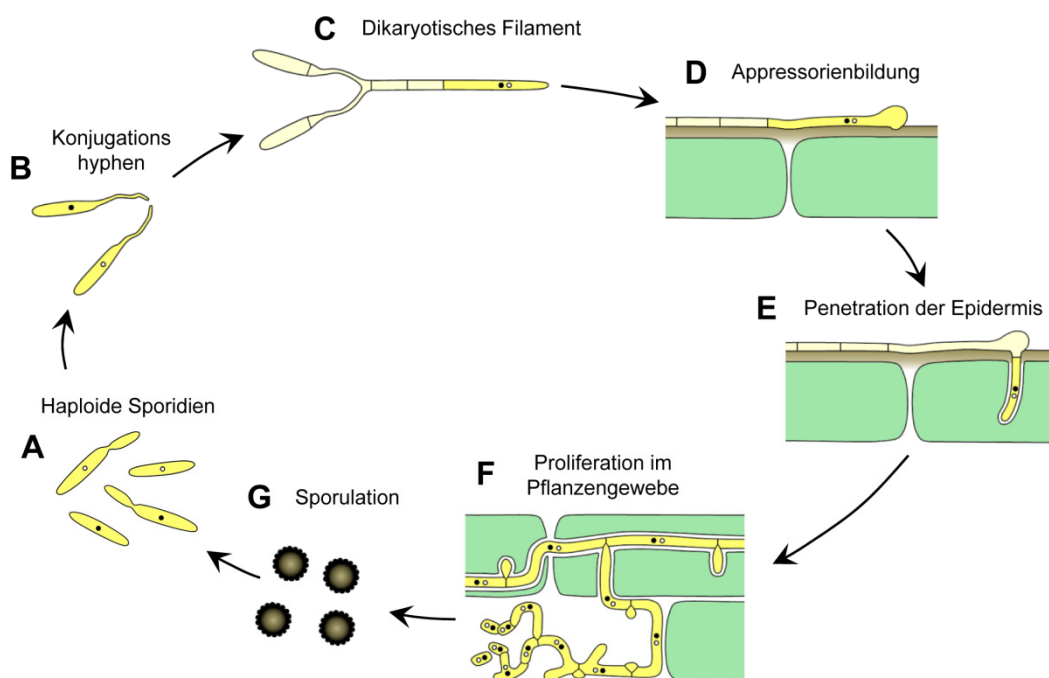
#### 1.4.1 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Der Lebenszyklus von *U. maydis* unterteilt sich in eine saprophytische und eine biotrophische Phase. Saprophytische, haploide Sporidien vermehren sich asexuell durch hefeartige Knospung (Abb. 3A). Voraussetzung für eine Infektion ist die Fusion zweier kompatibler Sporidien, die unterschiedliche Allele der Paarungstyploci tragen (Rowell und DeVay, 1954). Der biallelische *a*-Paarungstyplocus codiert für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-System (Mfa/Pra) und dient der Zell/Zell Erkennung und Fusion (Bölker *et al.*, 1992). Die Perzeption von Pheromon führt zur Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und an ihren Spitzen miteinander fusionieren (Abb. 3B; Bowman, 1946; Bölker *et al.*, 1992; Snetselaar und Mims, 1992; Spellig *et al.*, 1994; Snetselaar *et al.*, 1996). Die anschließende Bildung eines dikaryotischen Filaments ist abhängig von dem multiallelischen *b*-Paarungstyplocus (Rowell, 1955; Holliday, 1961; Pulhalla, 1968). Dieser Locus codiert für zwei Transkriptionsfaktoren (bE/bW), die dimerisieren, wenn sie von unterschiedlichen Allelen codiert werden (Gillissen *et al.*, 1992; Yee und Kronstad, 1993; Kämper *et al.*, 1995). Dimerisierung ist Voraussetzung für die Bildung eines dikaryotischen Filaments, welches die infektiöse Form von *U. maydis* darstellt.

Das Dikaryon zeigt Spitzenwachstum; distale Hyphensegmente werden durch regelmäßige Septierung von der Cytoplasma gefüllten Spitzenzelle getrennt, wodurch leere Abschnitte entstehen (Abb. 3C; Day und Anagnostakis, 1973; Banuett und Herskowitz, 1994a). Der Zellzyklus ist in diesem Stadium in G2 arretiert (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar, 1993; Garcia-Muse *et al.*, 2003; Sgarlata und Perez-Martin, 2005). An geeigneten Stellen auf der Pflanzenoberfläche differenzieren die Spitzenzellen Appressorien (Abb. 3D; Snetselaar und Mims, 1992). Dieser Prozess wird über die Hydrophobizität der Oberfläche und Cutin Monomere stimuliert (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Morphologisch zeichnen sich die Appressorien lediglich durch eine leicht geschwollene Filamentspitze aus, die weder melanisiert, noch durch ein Septum vom Rest



der Zelle getrennt sind (Snetselaar und Mims, 1992, 1993). Daher wird vermutet, dass die Penetration nicht über mechanischen Druck erfolgt, sondern die Sekretion lytischer Enzyme den Eintritt in die Epidermiszelle ermöglicht (Schirawski *et al.*, 2005; Doehlemann *et al.*, 2008a). Während des Penetrationsvorgangs invaginiert die Cytoplasmamembran der Wirtszelle und umgibt die penetrierende Hyphe (Abb. 3E). Dadurch entsteht eine biotrophe Interaktionszone. Während des Wachstums auf der Pflanzenoberfläche kommt es zu einer Erkennung von *U. maydis*, vermutlich über PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) und zur Elizitierung von Abwehrgenen. Nach Penetration wird die basale Immunantwort der Wirtspflanze *Zea mays* durch *U. maydis* unterdrückt und es kommt zu einer biotrophen Interaktion (Doehlemann *et al.*, 2008b). Sekretierte Proteine, sogenannte Effektoren, die in die apoplastische Interaktionszone abgegeben, und eventuell auch von Pflanzenzellen aufgenommen werden, haben dabei eine essentielle Funktion (Doehlemann *et al.*, 2009; K. Schipper und R. Kahmann, pers. Mitteilung).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*.** Der Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in ein saprophytisches (A-D) und ein biotrophes Stadium (E-G) unterteilen. Nähere Informationen finden sich im Text.

Nach Etablierung der biotrophen Interaktion wird der Zellzyklusarrest wieder aufgehoben und die Hyphen proliferieren zunächst intrazellulär, wobei Schnallen-ähnliche Fortsätze die Kernverteilung koordinieren (Abb. 3F; Snetselaar und Mims, 1993, 1994; Scherer *et al.*, 2006). Später dringen die Hyphen in die Zellschichten des Mesophylls vor. Die

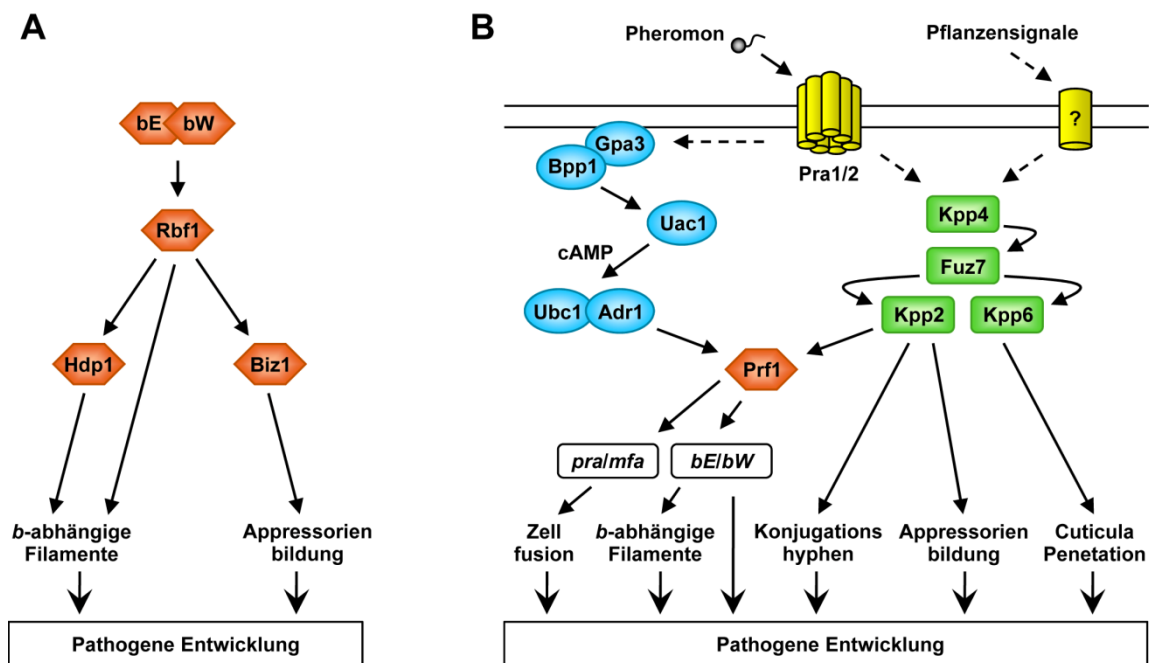
Tumorentwicklung, die mit einer Vergrößerung der Pflanzenzellen sowie ungleichmäßigen Zellteilungen einhergeht, wird unter Gewächshausbedingungen etwa vier Tage nach Infektion induziert (Snetselaar und Mims, 1994; Doehlemann *et al.*, 2008a). Im Verlauf von sechs bis zwölf Tagen bilden sich im Tumorgewebe große Aggregate, die ausschließlich aus Pilzmaterial bestehen und in apoplastische Zwischenräume eingebettet sind (Snetselaar und Mims, 1994; Banuett und Herskowitz, 1994a; Doehlemann *et al.*, 2008a). Hier findet die Karyogamie statt; die Hyphen fragmentieren, runden sich ab und reifen zu diploiden Teliosporen (Abb. 3F und G; Banuett und Herskowitz, 1996). Diese werden nach der Freisetzung aus reifen Tumoren über Wind, Regen, Insekten oder andere Tiere verbreitet und bleiben über Jahre keimungsfähig (Christensen, 1963). Beim Auskeimen der Sporen entstehen Probasidien in denen die Meiose erfolgt (Christensen, 1963). Nach dem Einwandern der haploiden Kerne in den Schlauch der Probasidie, werden haploide Sporidien sukzessive abgeschnürt und der Lebenszyklus kann von neuem beginnen.

#### 1.4.2 Das regulatorische *b*-Netzwerk

Nach erfolgreicher Zellfusion ist der *b*-Paarungstyplocus essentiell für die Etablierung und Aufrechterhaltung des infektiösen dikaryotischen Filaments. Der *b*-Locus kann somit als molekularer Schalter für den Beginn der pathogenen Entwicklung angesehen werden (Kahmann und Kämper, 2004). Die beiden von ihm codierten Homeodomänen Proteine, bE und bW, bilden einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, wenn die Genprodukte verschiedener allelischer Herkunft sind (Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995; Romeis *et al.*, 2000; Brachmann *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften ist es gelungen solopathogene haploide Stämme herzustellen. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie unterschiedliche Allele von bE und bW exprimieren, d.h. einen aktiven Transkriptionsfaktor bilden. Damit sind sie in der Lage, ohne vorherige Zellfusion Maispflanzen zu infizieren und den Lebenszyklus vollständig zu durchlaufen (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006).

Bislang konnten 345 Gene identifiziert werden, die durch das bE/bW Heterodimer reguliert werden (Heimel *et al.*, 2010). Interessanterweise unterliegen jedoch nur wenige dieser Gene einer direkten Regulation von bE/bW, welches an ein konserviertes Sequenzmotiv, der sogenannten *bbs* (*b-binding sequence*), bindet (Romeis *et al.*, 2000; Brachmann *et al.*, 2001). Etwa 90% aller *b*-abhängig regulierten Gene werden durch Rbf1

(*regulator of b-filaments*) reguliert, einem C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor, dessen eigene Expression über eine *bbs* direkt *b*-abhängig ist (Heimel *et al.*, 2010). Rbf1 ist notwendig und ausreichend für das *b*-vermittelte filamentöse Wachstum und stellt somit den zentralen Regulator der *b*-Kaskade dar (Abb. 4A; Heimel *et al.*, 2010). Rbf1 induziert die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, darunter *hdp1* (*homeodomain protein 1*) und *biz1* (*b-induced zinc finger protein*; Abb. 4A; Heimel *et al.*, 2010). Hdp1 partizipiert an der Filamentbildung, ist jedoch für die Pathogenität nicht relevant (Pothiratana, 2007). Biz1 hingegen ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor; *biz1* Deletionsmutanten zeigen eine drastisch reduzierte Appressorienbildung, während die Filamentbildung nicht beeinträchtigt ist (Flor-Parra *et al.*, 2006).



**Abb. 4: Signaltransduktionskaskaden für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*.** (A) Das *b*-Netzwerk besteht aus einer hierarchischen Abfolge von Transkriptionsfaktoren, die für die pathogene Entwicklung zuständig sind. Nähere Informationen finden sich im Text. (B). Während der Pheromonantwort wird Prf1 durch die MAP-Kinase Kaskade und den cAMP-Signalweg aktiviert. Prf1 induziert die Expression der *a*-Gene (*pra/mfa*) und *b*-Gene (*bE/bW*). Während der pathogenen Entwicklung hat die MAP-Kinase Kaskade weitere Aufgaben. Nähere Informationen finden sich im Text. Pfeile geben physikalische oder genetische Interaktionen an; gestrichelte Pfeile stehen für Interaktionen, die noch nicht nachgewiesen sind. Membranproteine (gelb), Transkriptionsfaktoren (rot), Komponenten des cAMP-Signalwegs (blau) und Komponenten der MAP-Kinase Kaskade (grün) sind dargestellt.

Das *b*-Netzwerk besteht also aus einer hierarchischen Abfolge von Transkriptionsfaktoren, die eine koordinierte Regulation der pathogenen Entwicklung zulassen. Unterhalb von Rbf1 erfolgt eine Trennung in Abzweigungen, die spezifisch für Filamentbildung und Appressorienbildung sind (Abb. 4A).

### 1.4.3 Die MAP-Kinase Signalkaskade

Die Verarbeitung des Pheromonsignals und die anschließende pathogene Entwicklung erfordern das Zusammenspiel einer MAP-Kinase Signalkaskade und eines cAMP-Signalwegs (Abb. 4B; für eine Übersicht: Brefort *et al.*, 2009), wobei nur die MAP-Kinase Kaskade hier eine ausführliche Erwähnung finden soll. Die Perzeption von Pheromon durch den Pheromonrezeptor Pra führt zu einer Aktivierung beider Signalwege und resultiert in einer differenziellen Phosphorylierung von Prf1 (*pheromone response factor*), einem HMG (*high mobility group*)-Domänen Transkriptionsfaktor (Abb. 4B; Kaffarnik *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003b; Zarnack *et al.*, 2008). Im phosphorylierten Zustand induziert Prf1 die Expression der *a*-Gene (*mfa/pa*) und *b*-Gene (*bE/bW*), was Voraussetzung für die Zellfusion und die Bildung eines dikaryotischen Filaments ist (Abb. 4B; Hartmann *et al.*, 1996; Kaffarnik *et al.*, 2003).

Die drei Kernkomponenten des MAP-Kinase Moduls während der Pheromonantwort sind die MAPKK-Kinase Kpp4/Ubc4 (Andrews *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2003b), die MAPK-Kinase Fuz7/Ubc5 (Banuett und Herskowitz, 1994b; Andrews *et al.*, 2000) und die MAP-Kinase Kpp2/Ubc3 (Müller *et al.*, 1999; Mayorga und Gold, 1999; Abb. 4B). Die Konjugationshyphenbildung während der Paarungsreaktion erfolgt unabhängig von Prf1 und wird durch Kpp2 gesteuert (Müller *et al.*, 2003b). Für die pathogene Entwicklung ist noch eine weitere MAP-Kinase nötig, Kpp6, die starke Ähnlichkeit zu Kpp2 aufweist und ebenfalls von Fuz7 phosphoryliert wird (Abb. 4B; Brachmann *et al.*, 2003; Di Stasio *et al.*, 2009). *kpp6* gehört zu den *b*-induzierten Genen, wird in haploiden Sporidien kaum exprimiert und hat keine Bedeutung für die Paarungsreaktion (Brachmann *et al.*, 2003). Durch Verwendung eines nicht phosphorylierbaren Allels von Kpp6 konnte gezeigt werden, dass Kpp6 für die Penetration der Pflanzenoberfläche benötigt wird, während die Differenzierung von Appressorien unbeeinträchtigt bleibt (Brachmann *et al.*, 2003). Kpp2 hingegen besitzt eine Funktion bei der Appressorienbildung: Die Expression eines nicht phosphorylierbaren Kpp2-Allels führt neben einer stark abgeschwächten Filamentbildung auch zu einer reduzierten Appressorienbildung (Müller *et al.*, 2003b). Im Gegensatz zu *kpp2* und *kpp6* Einzeldelentionsmutanten ist eine *kpp2/kpp6* Doppeldeletionsmutante apathogen und zeigt somit den gleichen Virulenzphänotyp wie Stämme, in denen *fuz7* oder *kpp4* deletiert wurden (Banuett und Herskowitz, 1994b; Müller *et al.*, 2003b; Brachmann *et al.*, 2003). Die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 haben also teilweise überlappende Funktionen während der pathogenen Entwicklung. In solopathogenen Stämmen führten die

Deletionen der für die MAP-Kinase Kaskade codierenden Gene ebenfalls zu einem Virulenzverlust (Müller *et al.*, 2003b; Brachmann *et al.*, 2003). Dies zeigt, dass die MAP-Kinase Kaskade auch nach Zellfusion essentiell für die pathogene Entwicklung ist und den Penetrationsprozess über eine zeitlich versetzte Aktivierung von zwei MAP-Kinasen steuert (Abb. 4B).

Die Beobachtung, dass solopathogene Stämme, die ein aktives bE/bW Heterodimer exprimieren und nicht zu autokriner Pheromonstimulation fähig sind, ein intaktes MAP-Kinase Modul für ihre Virulenz benötigen, impliziert, dass Signale der Pflanze auf die MAP-Kinase Kaskade übertragen werden müssen (Müller *et al.*, 2003b). Mendoza-Mendoza *et al.* (2009b) konnten zeigen, dass die Hydrophobizität der Blattoberfläche ein solches Pflanzensignal ist. Die morphologische Differenzierung auf einer hydrophoben Oberfläche hängt von Kpp2 ab, benötigt jedoch keine Perzeption von Pheromon (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Es ist daher anzunehmen, dass in *U. maydis* Rezeptoren existieren, die Oberflächensignale wahrnehmen und an die MAP-Kinase Kaskade weiterleiten.

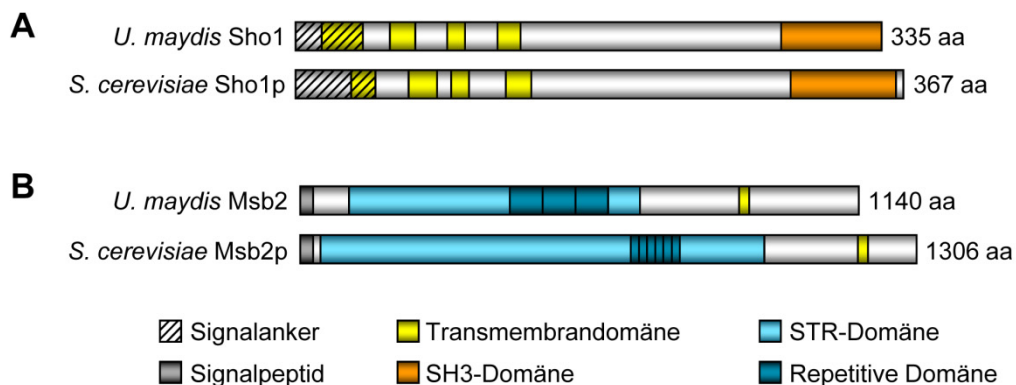
## 1.5 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von potentiellen Plasmamembranrezeptoren, die für die Perzeption von Oberflächensignalen nötig sind. Vorläufige Ergebnisse konnten bereits zeigen, dass Orthologe von *S. cerevisiae* Sho1p und Msb2p eine Funktion während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* haben (D. Lanver, nicht publiziert). In dieser Arbeit sollte der Virulenzphänotyp von *U. maydis sho1* und *msb2* Mutanten verifiziert werden und eine detaillierte phänotypische Charakterisierung dieser Stämme Aufschluss über die Funktion von Sho1 und Msb2 geben. Da Sho1 ursprünglich als Interaktionspartner der MAP-Kinase Kpp6 identifiziert wurde (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a), sollte ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit die Untersuchung der physiologischen Relevanz dieser Interaktion sein. Zudem sollten genetische Methoden genutzt werden, um Sho1 und Msb2 in Signaltransduktionswege einzuordnen. Ein weiteres Hauptaugenmerk sollte auf der funktionellen Analyse von Msb2 liegen, da die extrazelluläre Domäne von Msb2 Kapazitäten eines Sensors für extrazelluläre Stimuli besitzt.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Domänenarchitektur von Sho1 und Msb2 aus *U. maydis* und *S. cerevisiae*

Sho1 aus *U. maydis* (Um03156) ist ein 355 Aminosäuren langes Protein (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>). Es besitzt einen Signalanker (nicht gespaltenes Signalpeptid), vier Transmembrandomänen (Aminosäuren 15 - 37, 54 - 68, 87 - 98, 117 - 130) und eine C-terminale, cytoplasmatische SH3-Domäne (Aminosäuren 279 - 335; Abb. 5A). Damit hat Sho1 aus *U. maydis* eine nahezu identische Domänenarchitektur wie Sho1p aus *S. cerevisiae* (Abb. 5A; <http://yeastgenome.org/>). Die Aminosäureidentität beträgt 25% für die Volllängenproteine und 61% für die SH3-Domänen. *U. maydis* besitzt damit ein eindeutiges Sho1 Homolog; paraloge Proteine konnten für Sho1 in *U. maydis* nicht identifiziert werden (Krantz *et al.*, 2006; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>).



**Abb. 5: Domänenarchitektur von Sho1 und Msb2 aus *U. maydis* und *S. cerevisiae*.** (A) Schematische Darstellung von Sho1 aus *U. maydis* und Sho1p aus *S. cerevisiae*. Beide Proteine besitzen einen Signalanker (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), vier Transmembrandomänen (<http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/>) und eine C-terminale SH3-Domäne (<http://myhits.isb-sib.ch/>). (B) Schematische Darstellung von Msb2 aus *U. maydis* und Msb2p aus *S. cerevisiae*. Beide Proteine besitzen ein Signalpeptid (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), eine Transmembrandomäne (<http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/>) und eine Serin/Threonin-reiche (STR) Domäne (<http://myhits.isb-sib.ch/>). Innerhalb der STR-Domäne befinden sich repetitive Sequenzen. Die Länge der Proteine ist angegeben (A und B). aa: Aminosäuren.

Das Msb2 Protein aus *U. maydis* (Um00480) ist 1140 Aminosäuren lang (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) und besitzt alle charakteristischen Merkmale von Transmembranmucinen (Singh und Hollingsworth, 2006): ein Signalpeptid, eine Serin/Threonin-reiche Domäne (STR-Domäne), die sich von Aminosäure 102 bis 692 erstreckt und im Fall von *U. maydis* Msb2 drei identische Wiederholungen enthält

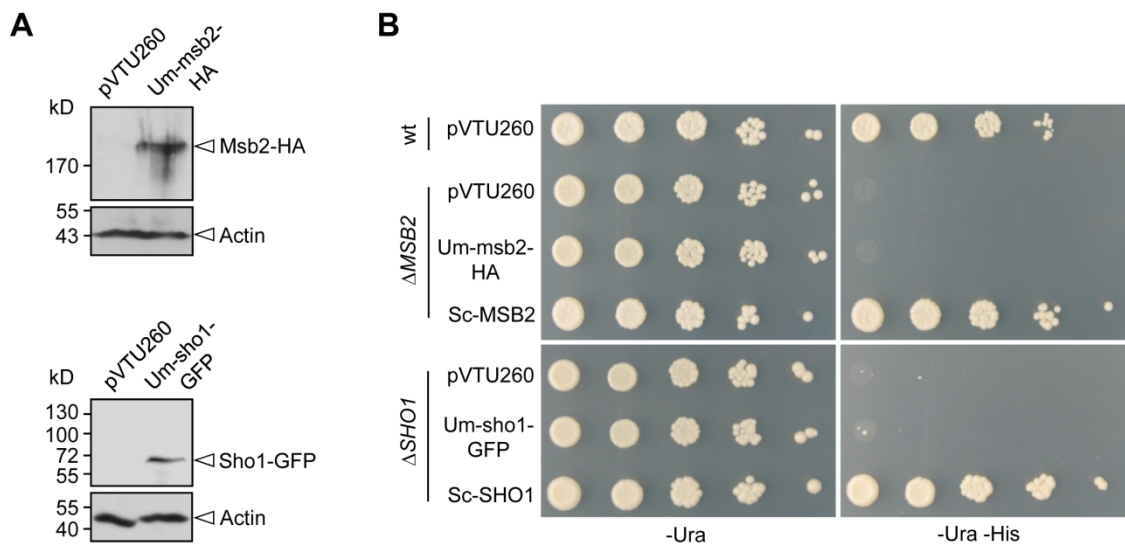
(Aminosäuren 430 - 636) sowie eine Transmembrandomäne (Aminosäuren 897 - 912; Abb. 5B). Die Domänenarchitektur von *U. maydis* Msb2 ist der von *S. cerevisiae* Msb2p (<http://yeastgenome.org/>) sehr ähnlich (Abb. 5B), wobei die Aminosäureidentität 28% beträgt. Die cytoplasmatischen C-Termini zeigen dabei nur eine sehr geringe Aminosäureidentität von 7%. *S. cerevisiae* Msb2p ist ein hoch glycosyliertes Protein und enthält sowohl O- als auch N-Glycosylierungen (Cullen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009). Mittels des Programms NetOGlyc (<http://cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) wurden für *U. maydis* Msb2 101 O-Glycosylierungsstellen vorhergesagt (96 für *S. cerevisiae* Msb2p) und das Programm NetNGlyc (<http://cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) sagte sieben N-Glycosylierungsstellen voraus (acht für *S. cerevisiae* Msb2p). *U. maydis* besitzt also mit Msb2 ein typisches Membranmucin. Weitere Transmembranmucine konnten in *U. maydis* nicht identifiziert werden (A. Fernandez-Alvarez, D. Lanver und J. I. Ibeas, nicht publiziert).

## 2.2 Sho1 und Msb2 aus *U. maydis* und *S. cerevisiae* sind keine funktionellen Homologe

Sho1 und Msb2 aus *U. maydis* weisen zwar eine nahezu identische Domänenarchitektur wie Sho1p und Msb2p aus *S. cerevisiae* auf (Abb. 5), zeigen jedoch nur eine Aminosäureidentität von 25% für die Sho1 Orthologen und 28% für die Msb2 Orthologen. Daher war fraglich, ob die *U. maydis* Proteine die Funktionen der entsprechenden *S. cerevisiae* Proteine übernehmen können. Um dies zu testen wurden *U. maydis sho1* und *msb2* in *SHO1*- bzw. *MSB2*-defizienten *S. cerevisiae* Stämmen exprimiert und ihre Fähigkeit zur Komplementation überprüft.

Der Hefestamm PC538 ist defekt für den Pheromon Signalweg und trägt einen *FUS1:HIS3* Reporter, welcher nur über den FG-Signalweg aktiviert werden kann (Cullen *et al.*, 2004). Derivate von PC538, in denen entweder *SHO1* oder *MSB2* deletiert ist, sind daher nicht in der Lage auf Medium ohne Histidin zu wachsen. Sie dienten als Ausgangsstämme für die Komplementationsversuche. Um die Expression der *U. maydis* Proteine in *S. cerevisiae* nachzuweisen, wurde eine C-terminale Fusion von Sho1 an GFP verwendet. Dieses Fusionsprotein ist in *U. maydis* biologisch aktiv (siehe Anhang, Abb. 37A). Desweiteren wurde ein Msb2 Derivat verwendet, das ein HA-Epitop zwischen Aminosäuren 709 und 710 integriert hatte. Das Msb2-HA Protein ist in *U. maydis* ebenfalls biologisch aktiv (siehe Anhang, Abb. 37B). Nach Integration von *sho1-gfp* und

*msb2-ha* in das frei replizierende Plasmid pVTU260 standen die Gene unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADHI* Promotors und wurden in die *S. cerevisiae* Stämme transformiert, in denen entweder *SHO1* oder *MSB2* deletiert waren. Die Komplementation mit *S. cerevisiae* *SHO1* und *MSB2*, ebenfalls in pVTU260 kloniert, diente als Kontrolle. Die Expression der *U. maydis* Proteine wurde über eine Western-Analyse nachgewiesen (Abb. 6A). Weder *U. maydis* *sho1* noch *U. maydis* *msb2* konnten den Wachstumsdefekt der jeweiligen *S. cerevisiae* Mutanten komplementieren (Abb. 6B). Die Expression von *S. cerevisiae* *SHO1* bzw. *MSB2* führte hingegen zu einer vollständigen Komplementation der jeweiligen Mutante (Abb. 6B). Dies zeigt, dass *U. maydis* Sho1 und Msb2 keine funktionellen Homologe von *S. cerevisiae* Sho1p und Msb2p darstellen.



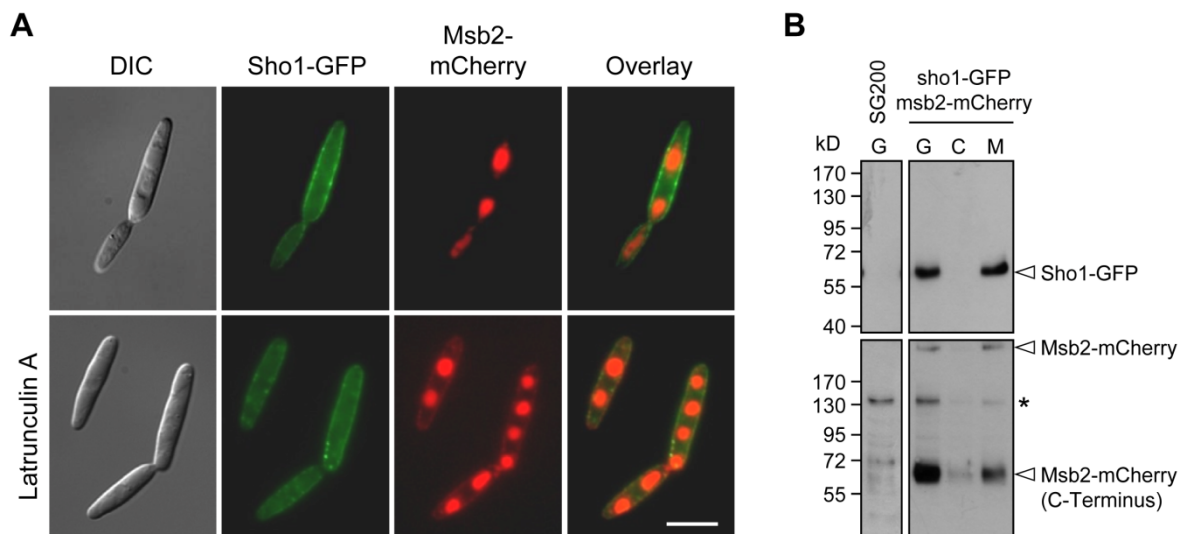
**Abb. 6: *U. maydis* Sho1 und Msb2 können die Funktion von Sho1p und Msb2p aus *S. cerevisiae* nicht komplementieren.** (A) Der Hefestamm PC948 wurde mit pVTU260 bzw. pVTU260-Um-msb2-HA transformiert (oben). Die Expression von Msb2-HA wurde durch Western-Analyse mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen. Der Hefestamm PC1531 wurde mit pVTU260 bzw. pVTU260-Um-sho1-GFP transformiert (unten). Die Expression von Sho1-GFP wurde durch Western-Analyse mit anti-GFP Antikörpern nachgewiesen. Actin diente als Ladekontrolle und wurde mit anti-Actin Antikörpern detektiert. Pfeilspitzen geben die detektierten Proteine an (rechts) und der Größenstandard ist links angegeben (B) Der Hefestamm PC538 (wt) wurde mit pVTU260 transformiert. Der *SHO1* Deletionsstamm PC1531 wurde mit pVTU260, pVTU260-Um-sho1-GFP oder pVTU260-Sc-SHO1 transformiert. Der *MSB2* Deletionsstamm PC948 wurde mit pVTU260, pVTU260-Um-msb2-HA oder pVTU260-Sc-MSB2 transformiert. Um auf Expression des *FUS1-HIS3* Reporters zu testen, wurden serielle Verdünnungen von Kulturen der angegebenen Transformanten auf Selektionsmedium (-Ura) oder auf Medium ohne Uracil und Histidin (-Ura -His) getropft. Die Platten wurden für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

## 2.3 Sho1 und Msb2 lokalisieren in der Cytoplasmamembran

Die vorhergesagten Transmembrandomänen in Sho1 in Verbindung mit dem putativen Sekretionssignal ließen vermuten, dass *U. maydis* Sho1 ein Plasmamembranprotein ist.



Vorläufige Experimente mit Hilfe einer C-terminalen *sho1-gfp* Fusion im nativen Locus des *U. maydis* SG200 Stammes brachten Anhaltspunkte, dass Sho1 an der Plasmamembran lokalisiert (D. Lanver, nicht publiziert). Diese Lokalisation konnte durch Fluoreszenzmikroskopie von *sho1-gfp* exprimierenden Zellen bestätigt werden. Sho1-GFP zeigte ein ungleichmäßig verteiltes und körniges Signal an der Plasmamembran (Abb. 7A). Die Lokalisierung von Sho1-GFP wurde auch durch eine Zellfraktionierung gezeigt. Sho1-GFP konnte ausschließlich in der Membranfraktion detektiert werden (Abb. 7B, oben). Dies bestätigt, dass es sich bei Sho1 um ein Plasmamembranprotein handelt.



**Abb. 7: Lokalisation von Sho1-GFP und Msb2-mCherry in haploiden Sporidien. (A)** SG200sho1-GFP/msb2m-Cherry Zellen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase (oben) oder nach Behandlung mit Latrunculin A (unten) mikroskopisch analysiert. Die Fluoreszenzsignale von Sho1-GFP und Msb2-mCherry (mitte) wurden übereinander gelegt (rechts). Die entsprechende DIC Durchlicht-Aufnahme ist links gezeigt. Der Längenmaßstab entspricht 10  $\mu$ m. **(B)** Zellen von SG200 und SG200sho1-GFP/msb2-mCherry wurden während des Wachstums in der exponentiellen Phase homogenisiert und der Gesamtzellextrakt (G) von SG200sho1-GFP/msb2-mCherry in eine Cytoplasma (C)- und eine Membranfraktion (M) getrennt. Sho1-GFP wurde durch eine Western-Analyse mit anti-GFP Antikörpern nachgewiesen. Msb2-mCherry wurde durch ein RFP-Antiserum nachgewiesen. Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an und der Größenstandard ist links angegeben. \*unspezifisches Hintergrundsignal.

Msb2 besitzt eine Transmembrandomäne nahe dem C-Terminus und ein N-terminales Sekretionssignal, was ebenfalls eine Lokalisation in der Plasmamembran vermuten lässt. Eine funktionelle C-terminale Fusion von *msb2* an *mcherry* (siehe Anhang, Abb. 37A) wurde in den nativen Locus des SG200sho1-GFP Stammes eingebracht. Das mCherry-Fluoreszenzsignal konnte jedoch nur in Vakuolen detektiert werden und nicht an der Plasmamembran (Abb. 7A, oben). Aufgrund dieser Lokalisation wurde angenommen, dass Msb2 nur transient in der Plasmamembran lokalisiert und möglicherweise eine Actin-

abhängige Endocytose zu einem Transport in die Vakuolen führt. Daraufhin wurden Zellen mit dem Actin-Polymerisationsinhibitor Latrunculin A behandelt. Latrunculin A wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um die Endocytose des Pheromonrezeptors Pra1 zu inhibieren (Fuchs *et al.*, 2006). Nach Behandlung von SG200sho1-GFP/msb2-mCherry mit Latrunculin A war das mCherry-Signal weiterhin in den Vakuolen zu finden, jedoch konnte zusätzlich ein schwaches mCherry-Signal an der Plasmamembran detektiert werden, welches mit Sho1-GFP co-lokalisierte (Abb. 7A, unten).

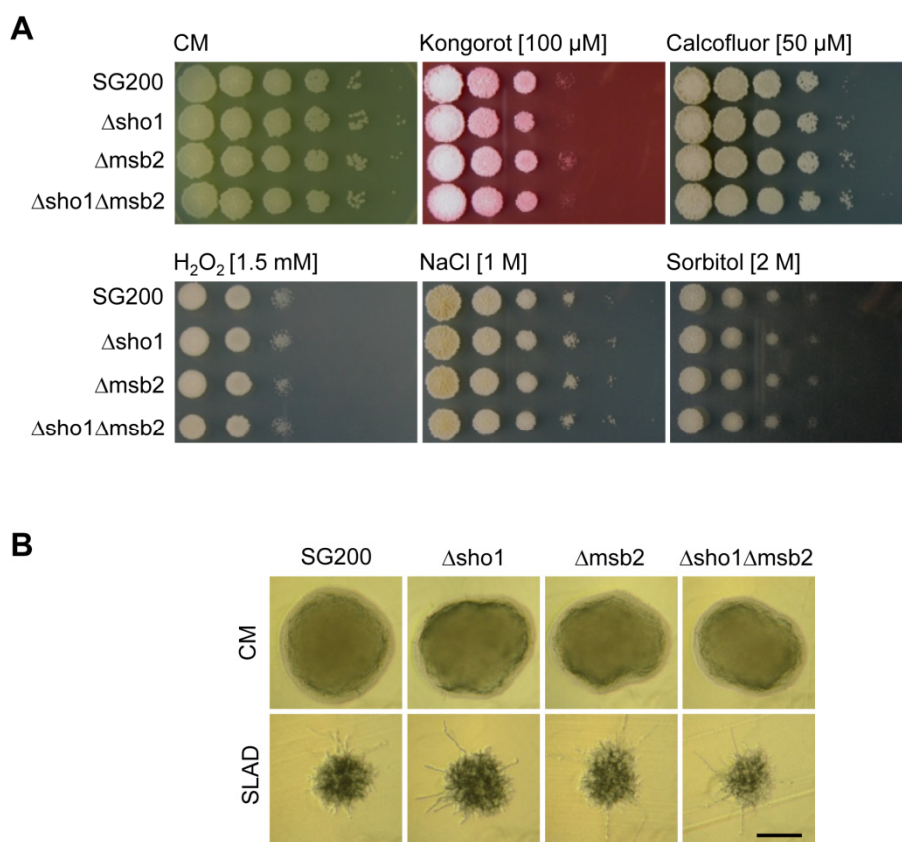
Das Msb2-mCherry Fusionsprotein hat eine vorhergesagte Masse von 145 kD. Die in Western-Analysen des Stammes SG200sho1-GFP/msb2m-Cherry tatsächlich detektierte Masse von über 170 kD (Abb. 7B, unten) ist auf die hohe Glycosylierung des Msb2 Proteins zurückzuführen (A. Fernandez-Alvarez, D. Lanver und J. I. Ibeas, nicht publiziert). Neben dem Volllängenprotein war eine Bande auf der Höhe von etwa 60 kD detektierbar. Dies deutete auf eine Prozessierung des Msb2 Proteins hin. Eine Zellfraktionierung ergab, dass sowohl das 60 kD Msb2-Fragment als auch das Volllängenprotein hauptsächlich in der Membranfraktion lokalisierten und nur zu einem geringen Anteil im Cytoplasma vorlagen (Abb. 7B, unten). Diese Ergebnisse zeigen, dass Msb2 ein Plasmamembranprotein ist, das über Actin-abhängige Endocytose internalisiert wird.

## **2.4 Die Rolle von Sho1 und Msb2 während des saprophytischen Wachstums und der Paarungsreaktion**

Um die biologische Funktion von Sho1 und Msb2 zu untersuchen, wurden in dem solopathogenen Stamm SG200 (*al:mfa2 bE1/bW2*) sowie in den kompatiblen Wildtypstämmen FB1 (*al b1*) und FB2 (*a2 b2*) *sho1* und *msb2* deletiert (Lanver *et al.*, 2010; diese Arbeit). Zudem wurden *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutanten generiert, um mögliche kooperative oder redundante Funktionen dieser Proteine aufzuzeigen (Lanver *et al.*, 2010; diese Arbeit). Bezüglich der Zellmorphologie und der Wachstumsrate in axenischer Kultur zeigte keiner der Stämme Unterschiede im Vergleich zum jeweiligen Referenzstamm (nicht gezeigt). Da Sho1 und Msb2 in vielen Pilzen die Antwort auf umweltbedingten Stress regulieren, wurde das Wachstum von *U. maydis sho1* und *msb2* Mutanten auch unter Stressbedingungen untersucht.

### 2.4.1 Die Reaktion auf umweltbedingten Stress wird durch Sho1 und Msb2 nicht beeinflusst

Um die Rolle von Sho1 und Msb2 unter Stressbedingungen zu testen, wurden SG200 $\Delta$ sho1, SG200 $\Delta$ msb2 und SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Wachstum auf CM-Medium diente als Kontrolle und durch Medienzusätze wurden Zellwandstress (Kongorot und Calcofluor), osmotischer Stress (Sorbitol und NaCl) und oxidativer Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induziert. Im Vergleich mit dem SG200 Referenzstamm konnte kein signifikanter Einfluss von *sho1* und *msb2* auf Stresssensitivität beobachtet werden (Abb. 8A).



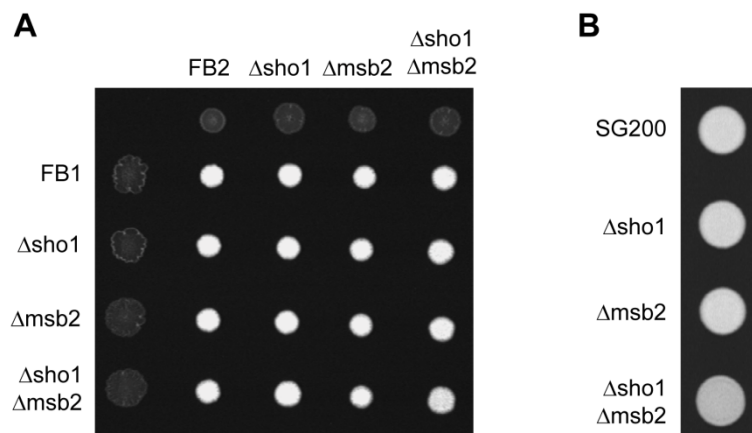
**Abb. 8: Reaktion auf Stresssituationen in *sho1* und *msb2* Mutanten.** (A) Serielle Verdünnungen von Kulturen der angegebenen Stämme wurden auf CM-Medium oder auf CM-Medium mit den angegebenen Stressoren getropft. Die Platten wurden für zwei Tage bei 28°C inkubiert. (B) Zellen der angegebenen Stämme wurden auf CM-Medium oder auf Stickstoffmangelmedium (SLAD) vereinzelt. Platten wurden für 36 h bei 28°C inkubiert. Einzelne Kolonien sind gezeigt. Der Längenmaßstab entspricht 50  $\mu$ m.

In *S. cerevisiae* wird bei Nährstoffmangel pseudohyphales Wachstum ausgelöst (Gimeno *et al.*, 1992), und für diese Reaktion sind Sho1p und Msb2p notwendig (Cullen *et al.*, 2004). Ähnlich wie in *S. cerevisiae* wird unter Stickstoffmangelbedingungen auch in *U.*

*maydis* filamentöses Wachstum auslöst (Smith *et al.*, 2003). Daher wurden SG200, SG200 $\Delta$ sho1, SG200 $\Delta$ msb2 und SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 auf Stickstoffmangelmedium (SLAD) vereinzelt. Nach 36 h ergab eine Analyse der Kolonimorphologie, dass alle Stämme in der Lage waren, filamentöse Kolonien zu bilden (Abb. 8B). Damit konnte Sho1 und Msb2 in *U. maydis* keine Rolle beim Schutz vor umweltbedingtem Stress zugewiesen werden.

#### 2.4.2 Die Paarungskompetenz ist unabhängig von Sho1 und Msb2

Auf aktivkohlehaltigem Medium bilden sich nach erfolgreicher Zellfusion kompatibler haploider Zellen dikaryotische Filamente, die aufgrund leerer Abschnitte in älteren Hyphenbereichen als weißes Myzel erscheinen (Day und Anagnostakis, 1973). Im Folgenden wurde ein Kreuzungstest kompatibler FB1 und FB2 Wildtypstämme sowie deren  $\Delta$ sho1,  $\Delta$ msb2 und  $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 Derivate durchgeführt. In allen Kreuzungen war nach 48 h ein dichtes weißes Myzel zu beobachten, das bei Kreuzungen von  $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 Stämmen etwas schwächer war als bei *sho1* und *msb2* Einzeldelensionsstämmen (Abb. 9A).



**Abb. 9: Paarungskompetenz und filamentöses Wachstum von *sho1* und *msb2* Mutanten.** (A) Die angegebenen haploiden *U. maydis* Stämme (links: FB1-derivative Stämme; oben: FB2-derivative Stämme) wurden entweder alleine, oder als kompatible Mischung (1:1) auf PD-Aktivkohlemedium getropft. Platten wurden für 48 h bei 28°C inkubiert. Weiße Kolonien zeigen Filamentbildung an. (B) Der solopathogene SG200 Stamm und die angegebenen Derivate wurden auf PD-Aktivkohlemedium getropft und die Platten für 24 h bei 28°C inkubiert.

Der solopathogene Stamm SG200, der ein kompatibles bE1/bW2 Heterodimer trägt und zusätzlich zu autokriner Pheromonstimulation fähig ist, kann ohne vorherige Zellfusion *b*-abhängige Filamente bilden und Maispflanzen infizieren (Kämper *et al.*, 2006). Wenn SG200 und dessen *sho1* und *msb2* Deletionsderivate auf aktivkohlehaltiges Medium

getropft wurden, konnte in allen Fällen Filamentbildung beobachtet werden, die in der *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutante ebenfalls geringfügig attenuiert war (Abb. 9B). Daraus lässt sich schließen, dass Sho1 und Msb2 für eine erfolgreiche Zellfusion nicht benötigt werden, jedoch eine periphere Bedeutung bei der Ausbildung von *b*-abhängigen Filamenten haben.

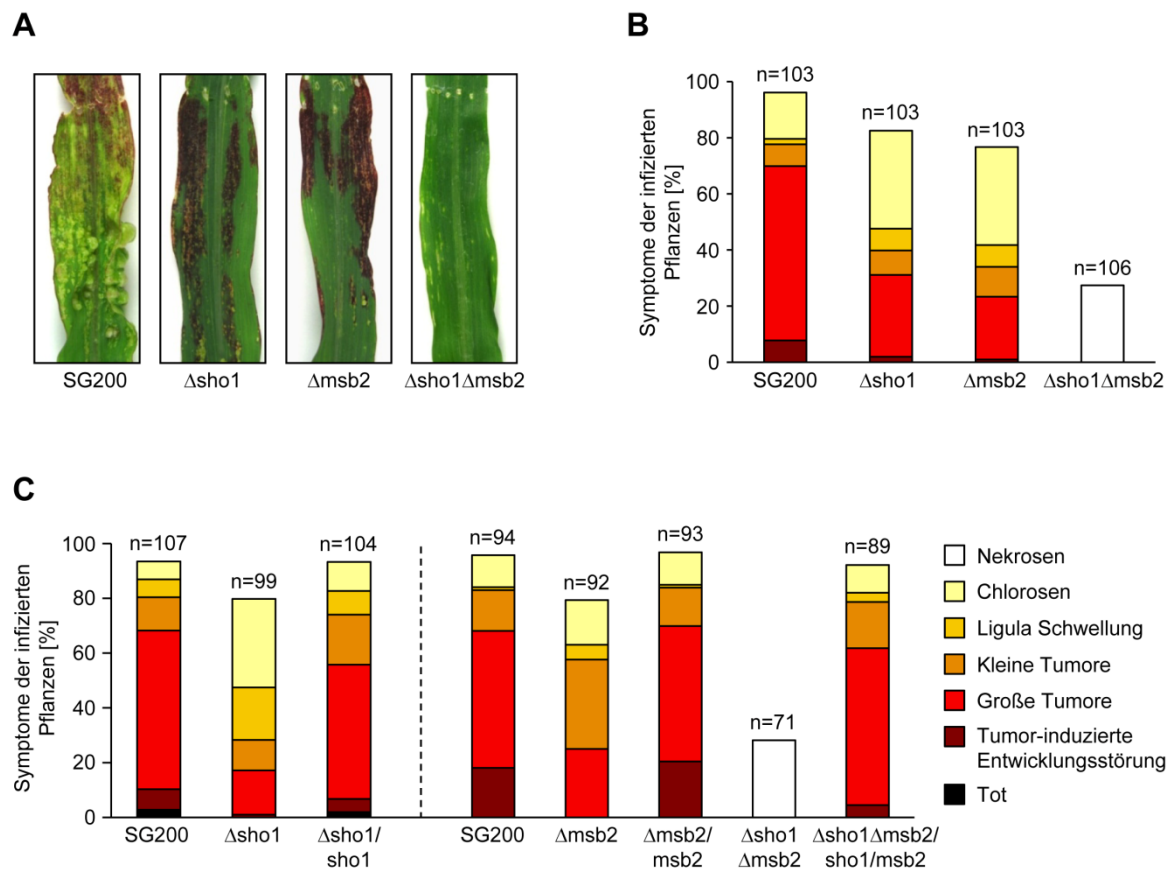
## **2.5 Der Einfluss von Sho1 und Msb2 auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis***

Vorläufige Ergebnisse deuteten an, dass die Deletion von *sho1* und *msb2* in einem solopathogenen Stamm zu einer reduzierten Pathogenität führt (D. Lanver und R. Kahmann, nicht publiziert). Diese Ergebnisse wurden im Folgenden verifiziert, durch Komplementationsanalysen abgesichert und durch Virulenztests kompatibler haploider Mutantenstämme erweitert.

### **2.5.1 Sho1 und Msb2 werden für die Pathogenität benötigt**

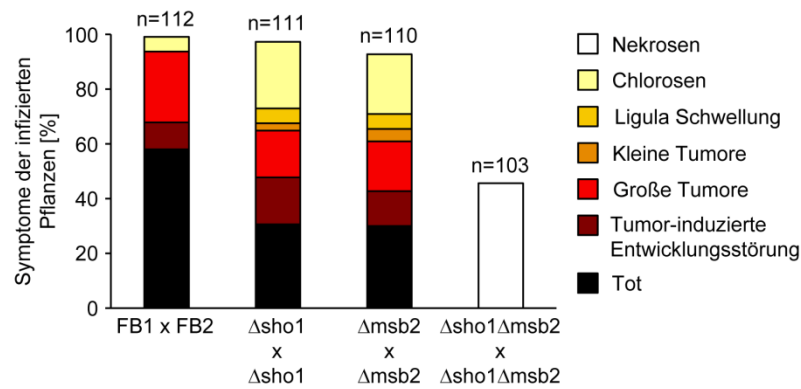
Die Stämme SG200, SG200 $\Delta$ sho1, SG200 $\Delta$ msb2 und SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 wurden bezüglich ihrer Virulenz überprüft. Dafür wurden Zellsuspensionen in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert und zwölf Tage nach Infektion die Symptome der Pflanzen quantifiziert. Im Vergleich zu Infektionen mit SG200 konnte eine reduzierte Tumorbildung in den Pflanzen beobachtet werden, die mit  $\Delta$ sho1 oder  $\Delta$ msb2 Stämmen infiziert wurden, wobei vor allem die Bildung großer Tumore stark reduziert war (Abb. 10A und B). Pflanzen, die mit SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 infiziert wurden, bildeten weder Tumore, noch waren Chlorosen und Anthocyanbildung ersichtlich. Die einzigen erkennbaren Symptome waren leichte Nekrosen, die sich nur selten zu größeren Läsionen entwickelten (Abb. 10A und B). Für die Komplementationsanalyse wurden *sho1* bzw. *msb2* unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren in Einzelkopie in den *ip* (*iron-sulphur protein*)-Locus von SG200 $\Delta$ sho1 bzw. SG200 $\Delta$ msb2 integriert. In Pathogenitätstests zeigte sich, dass die Stämme SG200 $\Delta$ sho1/*sho1* und SG200 $\Delta$ msb2/*msb2* eine mit SG200 vergleichbare Pathogenität aufwiesen (Abb. 10C). Desweiteren wurde ein *sho1/msb2* Doppelkonstrukt in den *ip*-Locus von SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 eingebracht. Auch dieser Stamm zeigte eine mit SG200 vergleichbare Virulenz (Abb. 10C). Diese Ergebnisse beweisen, dass die

beobachteten Virulenzdefekte der *sho1* und *msb2* Deletionsmutanten tatsächlich auf das Fehlen dieser Gene zurückzuführen ist.



**Abb. 10: Virulenz von *sho1* und *msb2* Mutanten.** (A) Die angegebenen Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Repräsentative Blätter zwölf Tage nach Infektion sind gezeigt. (B) Zwölf Tage nach Infektion mit den unter den Säulen angegebenen Stämmen wurden die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen quantifiziert. Die Symptome der einzelnen Pflanzen wurden nach Kämper *et al.* (2006) je nach Stärke in verschiedene Kategorien eingeteilt. Die Legende ist unten rechts gezeigt. Aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten wurden die Werte gemittelt und prozentual zu der Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt. (C) Komplementationsanalysen von *sho1* und *msb2* Einzeldeletionsmutanten sowie der Doppeldeletionsmutante. Die angegebenen Stämme wurden in Maispflanzen injiziert und die infizierten Pflanzen ausgewertet wie in B beschrieben.

Da der solopathogene Stamm SG200 ein künstlich erzeugter Stamm ist, wurde die Relevanz von *sho1* und *msb2* für die pathogene Entwicklung auch in den kompatiblen Wildtypstämmen FB1 und FB2 getestet. Kreuzungen von haploiden *sho1* und *msb2* Einzeldeletionsstämmen zeigten eine verringerte Virulenz im Vergleich zu Infektionen mit einer Mischung von FB1 und FB2 (Abb. 11). Kreuzungen von *sho1/msb2* Doppeldeletionsstämmen waren apathogen, was die Ergebnisse im SG200 Hintergrund bestätigt. Damit konnte gezeigt werden, dass Sho1 und Msb2 essentielle Virulenzfaktoren von *U. maydis* sind.



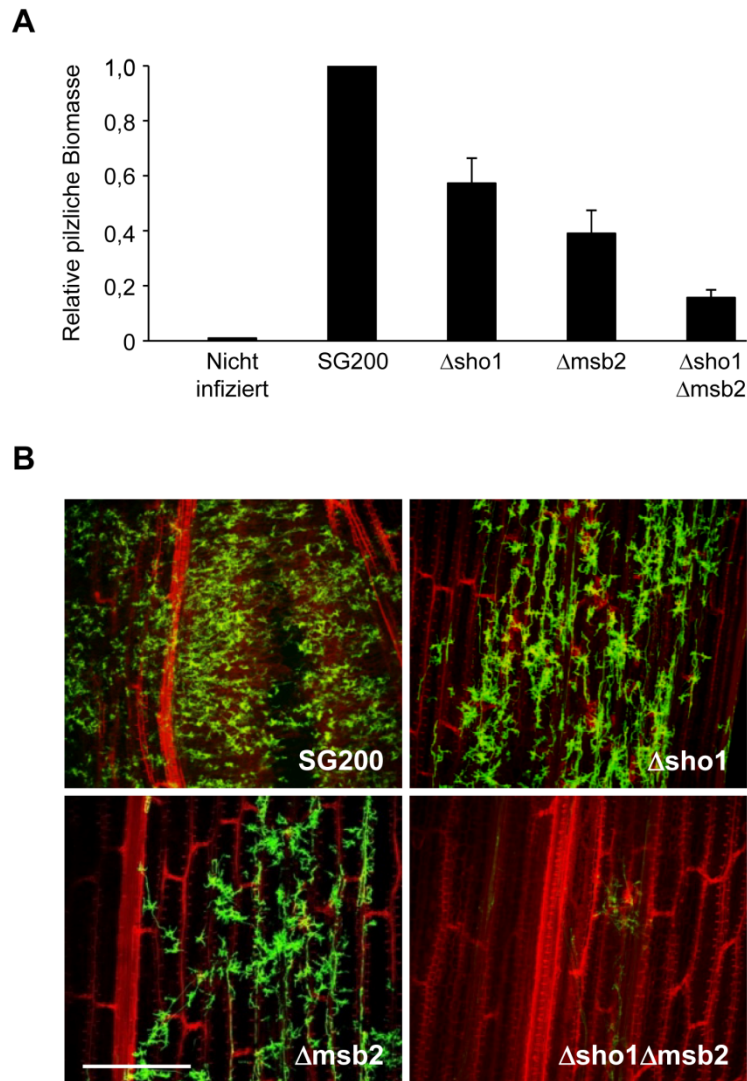
**Abb. 11: Virulenz von *sho1* und *msb2* Mutanten in kompatiblen haploiden Stämmen.** Kompatible Mischungen (1:1) der angegebenen FB1- bzw. FB2-derivativen Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Zwölf Tage nach Infektion wurden die Symptome der einzelnen Pflanzen nach Kämper *et al.* (2006) je nach Stärke in verschiedene Kategorien eingeteilt. Die Legende ist rechts gezeigt. Aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten wurden die Werte gemittelt und prozentual zu der Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt.

## 2.5.2 *sho1* und *msb2* Mutanten sind in der Kolonisation des Pflanzengewebes eingeschränkt

Um die pilzliche Biomasse innerhalb des Pflanzengewebes zu quantifizieren, wurden Blätter drei Tage nach Infektion geerntet und Pilzzellen auf der Blattoberfläche durch Behandlung mit flüssigem Latex entfernt. Anschließend wurde die gesamte DNA aus den Blattproben isoliert und anhand quantitativer „real-time“ PCR (qPCR) das pilzliche *mfaI* Gen sowie das pflanzliche *GAPDH* Gen amplifiziert. Auf diese Weise konnte die relative Pilzmasse innerhalb der Pflanze bestimmt werden. Im Vergleich zu SG200 war die Biomasse 1,8-fach in SG200Δ*sho1* und 2,6-fach in SG200Δ*msb2* reduziert. In der Doppeldeletionsmutante konnte eine 6,4-fach reduzierte pilzliche Biomasse bestimmt werden (Abb. 12A).

Um die Proliferation von *sho1* und *msb2* Mutanten innerhalb der Pflanze weiter zu untersuchen, wurden repräsentative Blätter sechs Tage nach Infektion mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Pflanzenzellwand wurde dabei mit PI (Propidiumiodid) gefärbt und die Färbung von Pilzmaterial erfolgte mit AF488 konjugiertem WGA (*wheat germ agglutinin*), einem Lectin mit hoher Affinität zu Chitin. In SG200 infizierten Blättern konnte eine massive Proliferation von Pilzhyphen beobachtet werden, während weniger Pilzmaterial in Blättern zu finden war, die mit SG200Δ*sho1* oder SG200Δ*msb2* infiziert wurden (Abb. 12B).



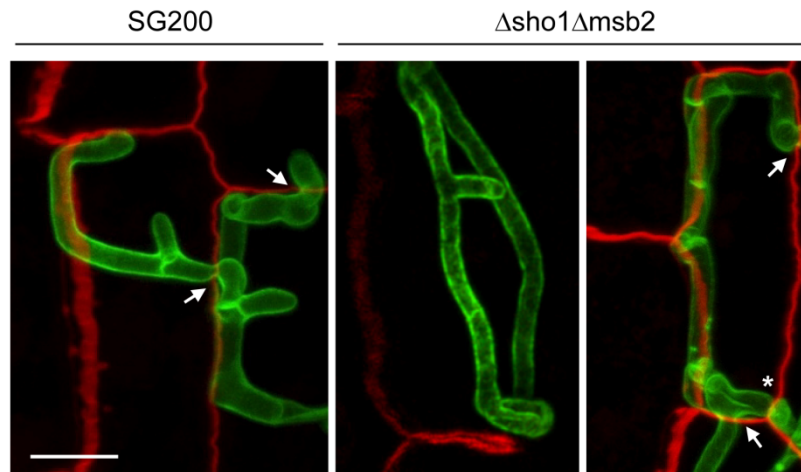


**Abb. 12: Kolonisation des Pflanzengewebes durch *sho1* und *msb2* Mutanten.** (A) Quantifizierung der relativen pilzlichen Biomasse durch qPCR. Maispflanzen wurden mit den angegebenen Stämmen infiziert und nach drei Tagen infiziertes Blattgewebe geerntet. Nicht infizierte Pflanzen dienten als Kontrolle. Zellen auf der Blattoberfläche wurden durch Behandlung mit flüssigem Latex entfernt und anschließend die DNA aus dem infizierten Gewebe isoliert. Zur Amplifikation von *U. maydis* DNA wurden *mfa*-spezifische Oligonukleotide verwendet. Mais DNA wurde mit Oligonukleotiden, die spezifisch für die *GAPDH* aus Mais sind, amplifiziert. Die Säulen geben das Verhältnis von pilzlicher DNA zu pflanzlicher DNA an. Das Verhältnis in SG200-infizierten Pflanzen wurde gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, mit 10 Blättern je Experiment und Stamm, sind dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. (B) Maispflanzen wurden mit den angegebenen Stämmen infiziert. Repräsentative Blätter sechs Tage nach Infektion wurden mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Pilzhyphen wurden mit WGA-AF488 (grün) und Pflanzenzellwände mit PI (rot) gefärbt. Konfokale Aufnahmen zeigen infiziertes Mesophyllgewebe im Bereich der Leitbündel. Der Längenmaßstab entspricht 50  $\mu$ m.

Nach Infektion mit SG200 $\Delta sho1\Delta msb2$  konnte nur selten Pilzmaterial im pflanzlichen Gewebe detektiert werden, und dieses beschränkte sich auf eine lokale Akkumulation weniger Hyphen, die sich kaum ausgebreitet hatten (Abb. 12B). Bei einer näheren Betrachtung der intrazellulär wachsenden SG200 $\Delta sho1\Delta msb2$  Hyphen zwei Tage nach



Infektion, konnten Defekte bei der Penetration von Zelle zu Zelle beobachtet werden (Abb. 13). Häufig wuchsen Hyphen über weite Strecken entlang der Zellwände bis anliegende Zellen penetriert wurden (Abb. 13). In SG200 Hyphen hingegen wurde eine effiziente Zell-Zell Penetration beobachtet (Abb. 13).



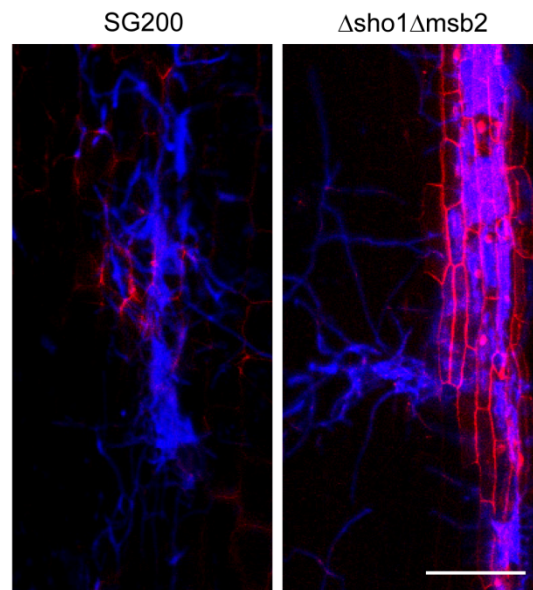
**Abb. 13: Intrazelluläres Wachstum von SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 im Vergleich zu SG200.** Maispflanzen wurden mit den angegebenen Stämmen infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde das intrazelluläre Wachstum der Hyphen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Pilzhypen wurden mit WGA-AF488 (grün) und Pflanzenzellwände mit PI (rot) gefärbt. Pfeile zeigen Penetrationen in benachbarte Zellen an. Der Längenmaßstab entspricht 10  $\mu$ m. \*Zwei Hyphen, die sich in verschiedenen Pflanzenzellen befinden, wachsen aufeinander zu.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass *sho1* und *msb2* Einzeldelentionsmutanten das Pflanzengewebe schlechter kolonisieren als SG200 und dass die Doppeldeletionsmutante einen nahezu vollständigen Kolonisationsdefekt hat.

### 2.5.3 Die *sho1/msb2* Doppelmutante induziert nach Infektion eine Pflanzenabwehr

Eine typische Abwehrreaktion von Pflanzen nach Erkennung eines Pathogens ist ein lokal begrenztes Absterben pflanzlicher Zellen am Infektionsort (Hammond-Kosack und Jones, 1996; Dangl und Jones, 2001). Bei Infektionen mit *sho1/msb2* Doppeldeletionsstämmen konnte makroskopisch die Bildung von Nekrosen beobachtet werden (siehe Kapitel 2.5.1). Um diese Symptome zu charakterisieren, wurden Blätter drei Tage nach Infektion mit CW (Calcofluor white) und PI gefärbt. Durch die hohe Affinität von CW zu  $\beta$ -1,4-Glucanen kann die Zellwand der Pilzhypen sichtbar gemacht werden. PI interkaliert in doppelsträngige DNA und färbt daher neben Pflanzenzellwänden auch Zellkerne. Da PI

nicht membranpermeabel ist, kann mit diesem Farbstoff zwischen lebenden und toten Zellen diskriminiert werden (Kroesen *et al.*, 1992).



**Abb. 14: SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 induziert pflanzlichen Zelltod.** Maispflanzen wurden mit den angegebenen Stämmen infiziert. Drei Tage nach Infektion wurden Blätter mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Pflanzenepidermis wurde mit PI gefärbt (rot) und Pilzmaterial auf der Blattoberfläche mit CW sichtbar gemacht (blau). Autofluoreszenz ist ebenfalls durch blaue Farbe gekennzeichnet. Der Längenmaßstab entspricht 100  $\mu$ m.

In Infektionen mit SG200 wurden die epidermalen Pflanzenzellwände kaum gefärbt (Abb. 14, links). In Infektionen mit SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 hingegen konnten, lokal begrenzt, starke Färbungen der Pflanzenzellwände und Zellkerne beobachtet werden und diese Epidermiszellen waren in Kontakt mit Pilzmaterial (Abb. 14, rechts). Zudem konnte eine starke Fluoreszenz innerhalb der Zellen beobachtet werden, die auf Autofluoreszenz zurückzuführen ist und ein typisches Merkmal von Pflanzenabwehrreaktionen darstellt (Hammond-Kosack und Jones, 1996). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 eine Pflanzenabwehr induziert, die mit dem Zelltod des befallenen Gewebes einhergeht.

## 2.6 Die Funktion von Sho1 und Msb2 während der Bildung von Infektionsstrukturen

Da *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutanten kaum innerhalb des pflanzlichen Gewebes zu finden waren, filamentöses Wachstum außerhalb der Pflanze jedoch möglich war, konnte ein Penetrationsdefekt vermutet werden. Ausgehend von dieser Überlegung wurde die

Appressorienbildung von *sho1* und *msb2* Mutanten auf der Pflanzenoberfläche analysiert. Die Bildung von Filamenten und Appressorien wird in *U. maydis* durch hydrophobe Oberflächen sowie langkettige Hydroxy-Fettsäuren ausgelöst (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). In SG200 induziert 16-Hydroxy-Palmitinsäure (im Folgenden mit HPS bezeichnet) Filamente, die vollständig mit Cytoplasma gefüllt sind. Hydrophobe Oberflächen wie Parafilm hingegen induzieren die Bildung septierter Filamente, die morphologisch denen auf der Pflanzenoberfläche entsprechen. Zudem wird unter diesen Bedingungen bereits eine geringe Menge Appressorien gebildet. Eine effiziente Appressorienbildung, wie sie auf der Pflanzenoberfläche stattfindet, kann induziert werden wenn das Oberflächensignal mit dem Fettsäuresignal kombiniert wird (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Die jeweilige Reaktion von *sho1* und *msb2* Mutanten auf diese Signale wurde im Folgenden ebenfalls untersucht.

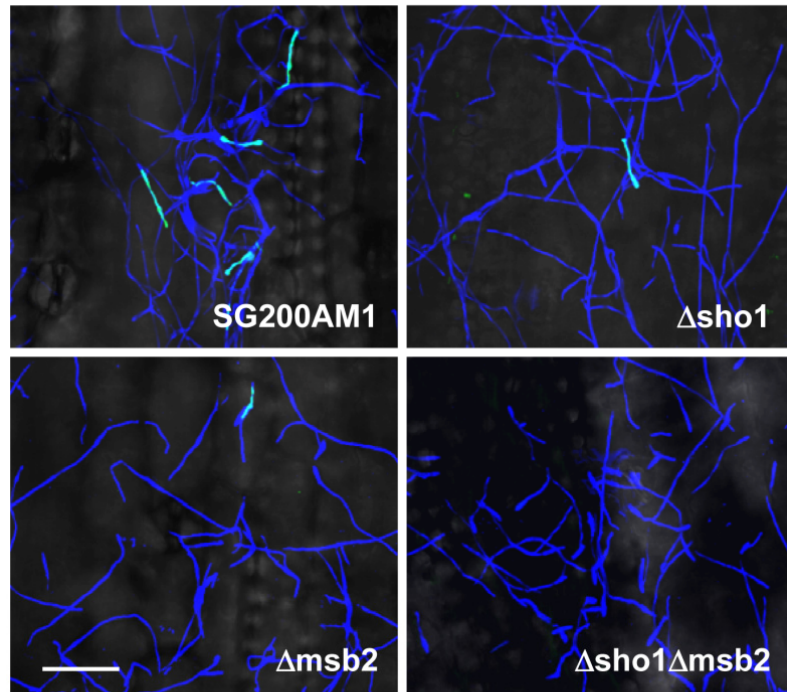
### 2.6.1 Sho1 und Msb2 werden für die Appressorienbildung benötigt

Im Vergleich zu Appressorien in anderen phytopathogenen Pilzen sind Appressorien in *U. maydis* schwierig zu erkennen, da sie sich nur durch eine leichte Verdickung an der Filamentspitze von den übrigen Filamenten unterscheiden. Aus diesem Grund wurde das Reporterkonstrukt AM1 (*appressoria marker 1*) entwickelt. Dieses Konstrukt besteht aus einer Fusion von *3xgfp* an den *um01779* Promotor, der während der Appressorienbildung stark induziert ist. Daher ist in Stämmen, die das AM1 Konstrukt tragen, eine Visualisierung von Appressorien-ausbildenden Hyphen anhand von GFP-Fluoreszenz möglich (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Durch eine zusätzliche Färbung der Hyphen mit CW kann die relative Anzahl von Filamenten mit Appressorium zur Gesamtzahl aller Filamente bestimmt werden. Um die Appressorienbildung in *sho1* und *msb2* Mutanten zu untersuchen, wurde das Plasmid pAM1 in einzelner Kopie in den *ip*-Locus von SG200 $\Delta$ *sho1*, SG200 $\Delta$ *msb2* und SG200 $\Delta$ *sho1* $\Delta$ *msb2* eingebracht.

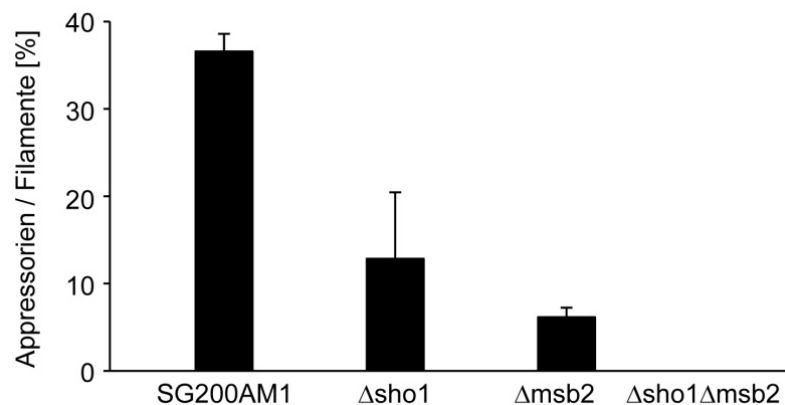
Die Appressorienbildung wurde 18 h nach Infektion von Maispflanzen quantifiziert. Obwohl auf der Pflanzenoberfläche eine vergleichbare Filamentbildung von SG200AM1, den Einzel- und den Doppeldeletionsmutanten beobachtet wurde (Abb. 15A), war die Appressorienbildung in SG200AM1 $\Delta$ *sho1* (p-Wert = 0,03) und SG200AM1 $\Delta$ *msb2* (p-Wert = 4,7E-05) im Vergleich zu SG200AM1 signifikant reduziert (Abb. 15A und B). Der  $\Delta$ *sho1* $\Delta$ *msb2* Stamm war nicht in der Lage Appressorien zu bilden (Abb. 15A und B).

Damit kommt den Proteinen Sho1 und Msb2 eine zentrale Bedeutung während der Entwicklung von Appressorien zu.

**A**



**B**

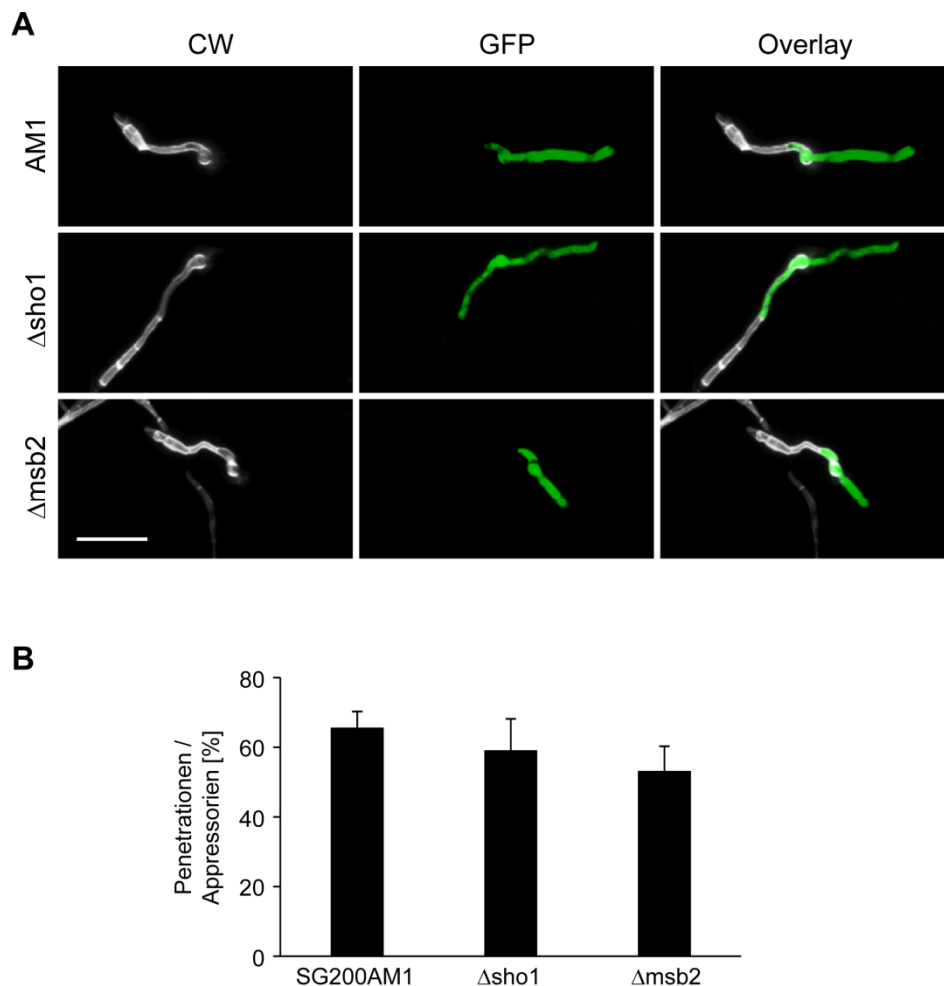


**Abb. 15: Appressorienbildung von *sho1* und *msb2* Mutanten auf der Pflanzenoberfläche.**

**(A)** Maispflanzen wurden mit SG200AM1 und den angegebenen Derivaten infiziert. 18 h nach Infektion wurde jeweils das dritte Blatt mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Pilzhyphen wurden mit CW gefärbt (blau) und die Bildung von Appressorien wird durch Appressorien-spezifische GFP-Expression angezeigt (grün). Beide Kanäle sowie die entsprechende Durchlicht-Aufnahme wurden übereinander gelegt. Der Längenmaßstab entspricht 50  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung der Appressorienbildung. Durch Verwendung der gleichen Stämme und Bedingungen wie in A beschrieben, wurde der prozentuale Anteil von Hyphen, die Appressorien gebildet haben zur Gesamtzahl aller Filamente bestimmt. In drei unabhängigen Experimenten wurden mehr als 900 Filamente je Stamm analysiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

### 2.6.2 Appressorien von *sho1* und *msb2* Einzeldelentionsmutanten penetrieren die Pflanzenoberfläche mit leicht verminderter Effizienz

Im nächsten Schritt wurden die Appressorien von *sho1* und *msb2* Einzeldelentionsmutanten auf ihre Fähigkeit untersucht, die Pflanzenoberfläche zu penetrieren. Da die Doppelmutante nicht in der Lage ist Appressorien zu bilden, konnte für diese Mutante keine Penetrationseffizienz bestimmt werden.



**Abb. 16: Bestimmung der Penetrationseffizienz von Appressorien der *sho1* und *msb2* Einzeldelentionsmutanten.** (A) Maispflanzen wurden mit SG200AM1 und den angegebenen Derivaten infiziert. 20 h nach Infektion wurde das jeweils dritte Blatt mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Pilzhyphen wurden mit CW gefärbt (links). Penetrierende Hyphen, die nicht durch CW gefärbt werden, konnten durch die Akkumulation von cytoplasmatischem GFP identifiziert werden (mitte). Beide Kanäle wurden übereinander gelegt (rechts). Der Längenmaßstab entspricht 10  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der Penetrationseffizienz. Durch Verwendung der gleichen Stämme und Bedingungen wie in A beschrieben wurde der prozentuale Anteil von Appressorien, die die Pflanzenoberfläche penetrierten zur Gesamtzahl der Appressorien bestimmt. In drei unabhängigen Experimenten wurden mehr als 60 Appressorien je Stamm analysiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

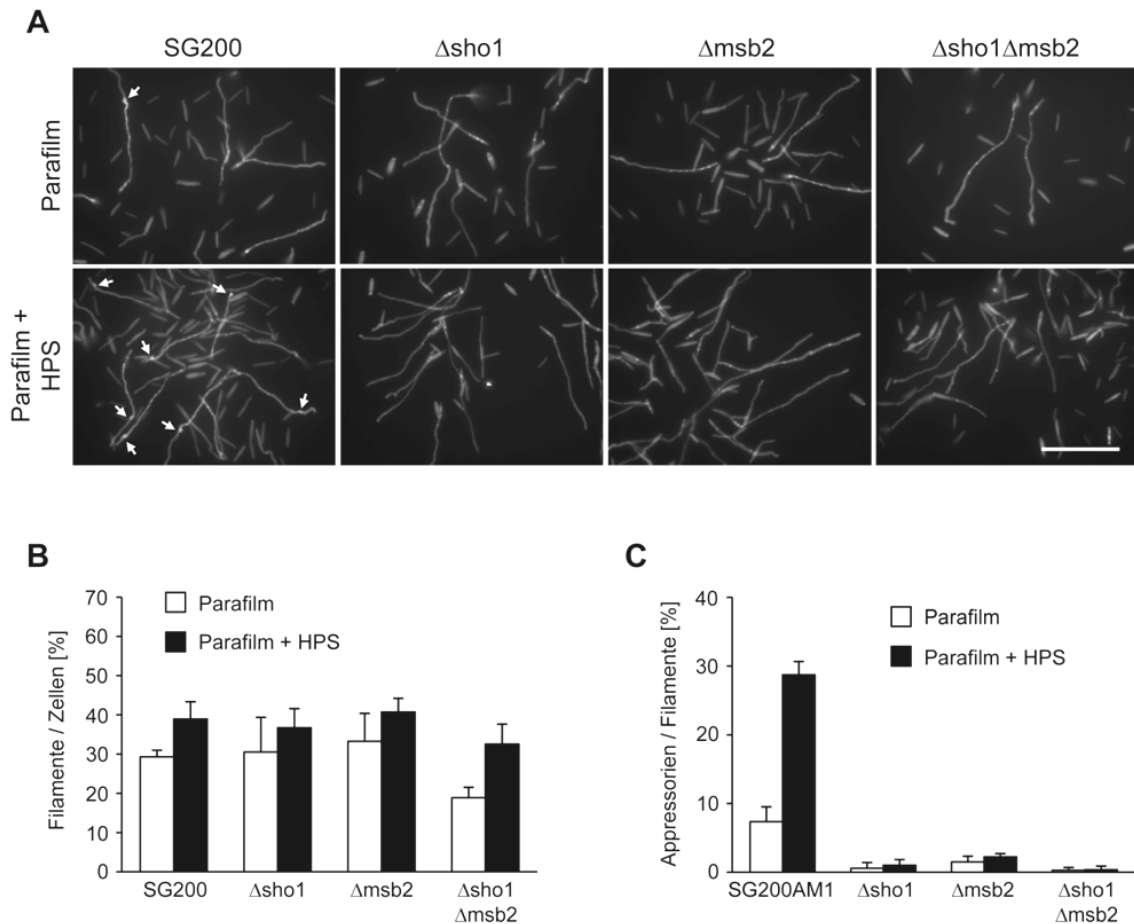
Die Visualisierung der Spitzenzelle von Appressorien-bildenden Hyphen war anhand der Appressorien-spezifischen GFP-Expression möglich. Zusätzlich wurden die Pilzhypen mit CW gefärbt. Da CW nicht in das Pflanzengewebe aufgenommen wird, konnte zwischen penetrierenden Hyphen und Hyphen, die sich ausschließlich auf der Oberfläche befanden, unterschieden werden. Eine mikroskopische Analyse zeigte, dass 20 h nach Infektion von Maispflanzen mit SG200AM1, SG200AM1 $\Delta$ sho1 und SG200AM1 $\Delta$ msb2 alle Stämme in der Lage waren die Pflanzenoberfläche zu durchdringen (Abb. 16A). Eine Quantifizierung der Penetrationsereignisse ergab, dass die Penetrationseffizienz von  $\Delta$ sho1 und  $\Delta$ msb2 Stämmen leicht reduziert war und im Fall der *msb2* Deletionsmutante signifikant von der Penetrationseffizienz des SG200AM1 Referenzstammes abwich (p-Wert = 0,04; Abb. 16B). Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die Penetrationseffizienz von *sho1* und *msb2* Einzeldelentionsmutanten kaum beeinträchtigt ist. Die reduzierte Virulenz dieser Mutanten lässt sich damit eher auf eine reduzierte Appressorienbildung zurückführen.

### **2.6.3 Die Differenzierung von *sho1* und *msb2* Mutanten auf hydrophoben Oberflächen ist eingeschränkt**

Die Untersuchungen auf der Pflanzenoberfläche ergaben, dass *sho1* und *msb2* Mutanten spezifische Defekte bei der Bildung von Appressorien aufweisen. Um das Verhalten von *sho1* und *msb2* Mutanten bezüglich Filament- und Appressorienbildung auf einer hydrophoben Oberfläche zu untersuchen, wurden Zellsuspensionen auf Parafilm aufgesprüht. Nach 18 h hatten alle Stämme septierte Filamente gebildet (Abb. 17A). Eine Quantifizierung ergab, dass  $\Delta$ sho1 und  $\Delta$ msb2 Stämme eine zu SG200 vergleichbare Anzahl von Filamenten bildeten, SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 im Vergleich zu SG200 jedoch signifikant weniger Filamente entwickelte (p-Wert = 0,03; Abb. 17A und B). Durch Zugabe von HPS konnte die Filamentbildung in allen Stämmen erhöht werden (Abb. 17A und B).

Bezüglich der Appressorienbildung konnte auf der hydrophoben Oberfläche eine drastische Reduktion sowohl in den *sho1* und *msb2* Einzelmутanten als auch in der Doppeldeletionsmutante beobachtet werden (Abb. 17A und C). Die Zugabe von HPS hatte auf die Appressorienbildung im SG200AM1 Referenzstamm einen stark fördernden Effekt, nur geringe Effekte in den  $\Delta$ sho1 und  $\Delta$ msb2 Derivaten und keinen Effekt in SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 (Abb. 17A und C). Damit zeigen *sho1* und *msb2* Einzelmутanten

unter den hier verwendeten *in vitro* Bedingungen einen nahezu vollständigen Verlust der Appressorienbildung, während Appressorienbildung auf der Pflanzenoberfläche möglich war (vgl. Abb. 15). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass *sho1* und *msb2* wichtige Funktionen bei der morphologischen Differenzierung auf hydrophoben Oberflächen besitzen.

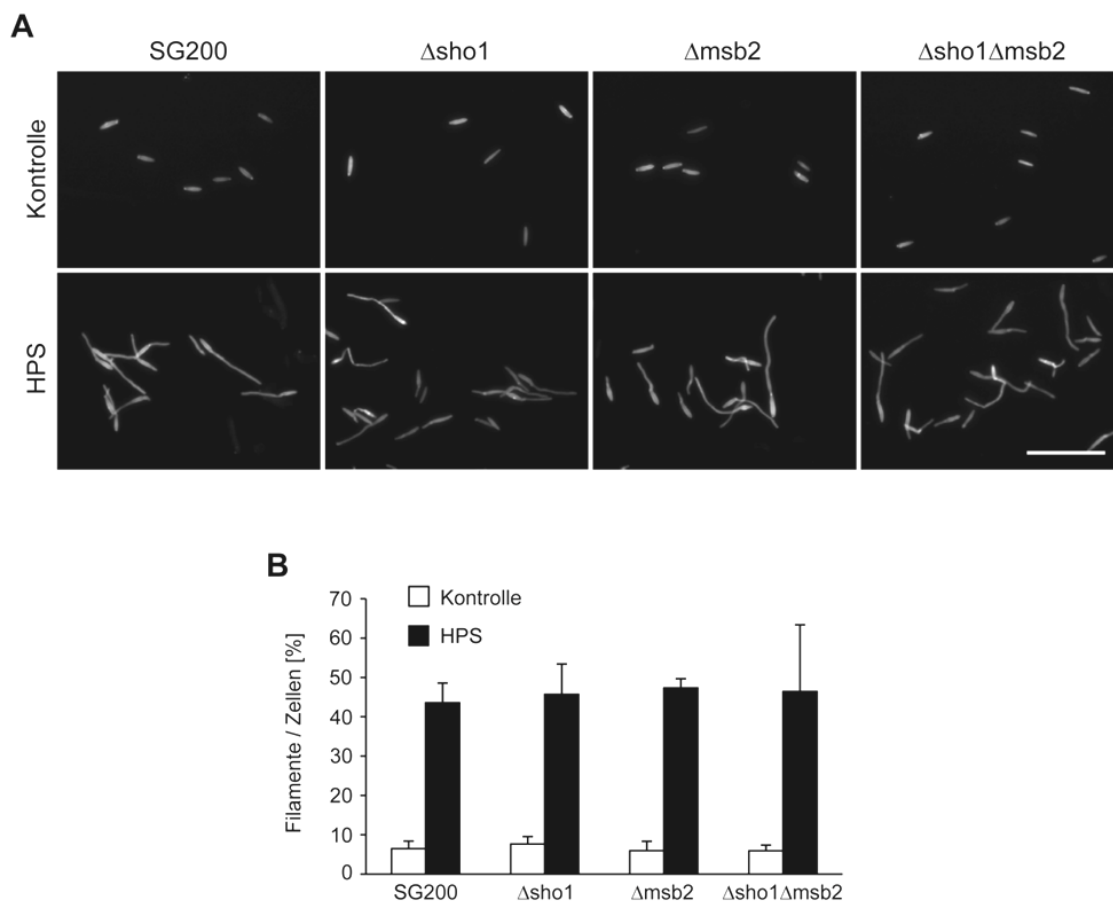


**Abb. 17: Morphologische Differenzierung von *sho1* und *msb2* Mutanten auf hydrophoben Oberflächen.** (A) Zellsuspensionen der angegebenen Stämme in 2% YEPSL wurden auf Parafilm oder unter Zugabe von HPS auf Parafilm gesprüht. Nach Inkubation für 18 h bei 28°C wurden die Zellen mit CW gefärbt und mikroskopisch analysiert. Pfeile zeigen Appressorienbildung an. In einigen Fällen wuchsen die Appressorien wieder als Hyphe aus, was zeigt, dass die artifizielle Oberfläche nicht penetriert werden konnte. Der Längenmaßstab entspricht 50  $\mu$ m. (B) Quantifizierung der Filamentbildung. Durch Verwendung der gleichen Stämme und Bedingungen wie in A beschrieben, wurde der prozentuale Anteil von Filamenten zur Gesamtzahl aller Zellen bestimmt. In drei unabhängigen Experimenten wurden mehr als 900 Zellen je Stamm und Bedingung analysiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. (C) Quantifizierung der Appressorienbildung. Durch Verwendung von SG200AM1 und dessen angegebenen Derivate wurde unter den in A beschriebenen Bedingungen der prozentuale Anteil von Hyphen, die Appressorien gebildet haben zur Gesamtzahl aller Filamente bestimmt. In drei unabhängigen Experimenten wurden mehr als 900 Filamente je Stamm und Bedingung analysiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.



### 2.6.4 Sho1 und Msb2 werden für die Reaktion auf Hydroxy-Fettsäuren nicht benötigt

Im Folgenden wurde die morphologische Reaktion von *sho1* und *msb2* Mutanten auf HPS unabhängig von einer hydrophoben Oberfläche getestet. Dafür wurden Zellen in Flüssigkultur mit 100  $\mu$ M HPS inkubiert. Nach 18 h wurde die Filamentbildung quantifiziert. Die *sho1* und *msb2* Einzelmутanten und die Doppelmutante verhielten sich wie der Referenzstamm SG200. Alle Stämme entwickelten eine vergleichbare Anzahl an Filamenten, und auch morphologisch ließen sich die gebildeten Filamente nicht voneinander unterscheiden (Abb. 18A und B). Damit erfolgt die Antwort auf HPS unabhängig von *sho1* und *msb2*.

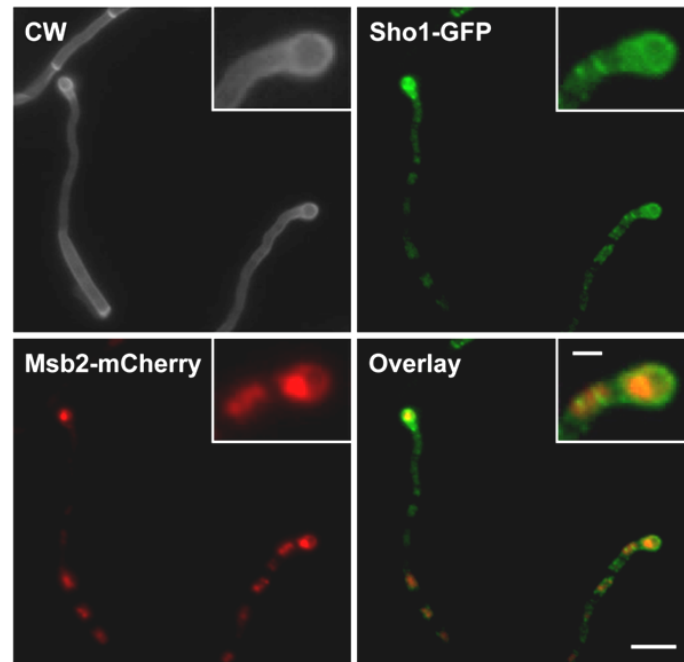


**Abb. 18: Morphologische Differenzierung von *sho1* und *msb2* Mutanten nach Behandlung mit Hydroxy-Fettsäuren. (A)** Die angegebenen Stämme wurden in 2% YEPSL mit 100  $\mu$ M HPS oder mit entsprechender Menge Ethanol (Kontrolle), dem Lösungsmittel von HPS, für 18 h bei 28°C inkubiert. Die Zellen wurden mit CW gefärbt und mikroskopisch analysiert. Der Längenmaßstab entspricht 50  $\mu$ m. **(B)** Quantifizierung der Filamentbildung. Durch Verwendung der gleichen Stämme und Bedingungen wie in A beschrieben, wurde der prozentuale Anteil von Filamenten zur Gesamtzahl aller Zellen bestimmt. In drei unabhängigen Experimenten wurden mehr als 900 Zellen je Stamm und Bedingung analysiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.



### 2.6.5 Sho1 und Msb2 Proteine akkumulieren in Appressorien

Da Sho1 und Msb2 wichtig für die Ausbildung von Appressorien sind, wurde ihre Lokalisation auch in diesem Entwicklungsstadium mit Hilfe des *in vitro* Appressoriensystems untersucht.



**Abb. 19: Lokalisation von Sho1-GFP und Msb2-mCherry in Appressorien.** Eine Zellsuspension von SG200sho1-GFP/msb2-mCherry<sup>con</sup> in 2% YEPSL mit 100  $\mu$ M HPS wurde auf Paraffin Wachs gesprüht und, wie in Abb. 17 beschrieben, inkubiert. Die Filamente wurden mit CW gefärbt (oben links) und Appressorien mikroskopisch analysiert. Die Fluoreszenzsignale von Sho1-GFP (oben rechts) und Msb2-mCherry (unten links) wurden übereinander gelegt (unten rechts). Das Appressorium auf der jeweils rechten Seite ist vergrößert dargestellt. Der Längenmaßstab entspricht 10  $\mu$ m, für die Vergrößerung 2  $\mu$ m.

Die Visualisierung von Sho1-GFP und Msb2-mCherry in Appressorien war aufgrund der hohen Hintergrundfluoreszenz von Parafilm nicht möglich. Deshalb wurde für diese Lokalisationsstudie Paraffinwachs als induktive Oberfläche verwendet. Desweiteren wurde die Expression von *msb2-mcherry* erhöht, indem das Gen unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors (Spellig *et al.*, 1996) gestellt wurde und dieses Konstrukt in den *ip*-Locus von SG200sho1GFP und SG200 $\Delta$ msb2 integriert wurde. Das Konstrukt konnte den Virulenzphänotyp von SG200 $\Delta$ msb2 komplementieren (siehe Anhang, Abb. 37C) und das konstitutiv exprimierte Msb2-mCherry zeigte in Sporidien eine vergleichbare Lokalisation wie das unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimierte Msb2-mCherry (nicht gezeigt). In Filamenten zeigte Sho1-GFP ein über das Filament unregelmäßig verteiltes körniges Signal, während Msb2-mCherry in Vakuolen detektiert wurde (Abb. 19). Für

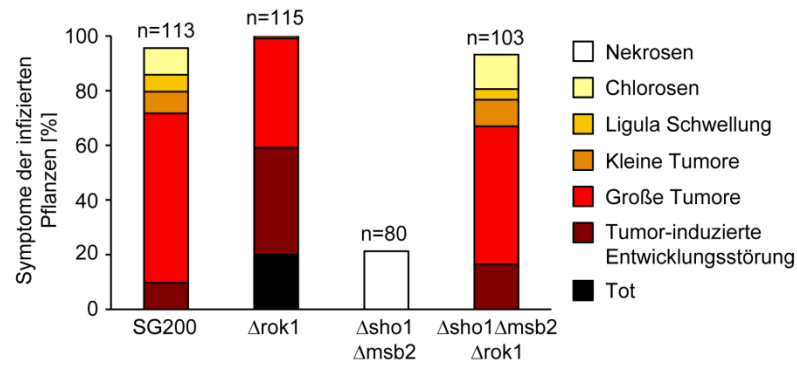
beide Proteine konnte eine starke Akkumulation im Appressorium beobachtet werden. Sho1-GFP zeigte das stärkste Signal an der Plasmamembran im Appressorium und Msb2-mCherry akkumulierte in Vakuolen, die sich im Innern des Appressoriums befanden (Abb. 19). Dies unterstützt, dass Sho1 und Msb2 eine wichtige Funktion während der Appressorienbildung besitzen.

## **2.7 Sho1 und Msb2 wirken oberhalb der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6**

In *U. maydis* ist die MAP-Kinase Kpp2 essentiell für die Differenzierung von Filamenten und Appressorien (Müller *et al.*, 1999; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b), während die MAP-Kinase Kpp6 den Penetrationsvorgang reguliert (Brachmann *et al.*, 2003). Aus *S. cerevisiae* war bekannt, dass Sho1p und Msb2p an der Spitze des FG-Signalwegs stehen und damit oberhalb der MAP-Kinase Kss1p agieren. Dies führte zu der Annahme, dass Sho1 und Msb2 in *U. maydis* oberhalb der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 wirken könnten. Im Folgenden wurde überprüft, ob eine konstitutive Aktivierung dieser MAP-Kinasen den Virulenzverlust von *sho1* und *msb2* Mutanten aufheben kann.

### **2.7.1 Die Deletion von *rok1* supprimiert den Virulenzdefekt von SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2**

Ein zentraler Bestandteil der negativen Regulation von MAP-Kinase Aktivität ist die Dephosphorylierung des TXY-Motivs der MAP-Kinasen durch dual-spezifische Phosphatasen (Keyse, 2000). In *U. maydis* sind die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 durch die dual-spezifische Phosphatase Rok1 negativ reguliert (Di Stasio *et al.*, 2009). Die Deletion von *rok1* führt zu einer konstitutiven Aktivierung von Kpp2 und Kpp6, die sich in einem hypervirulenten Phänotyp äußert (Abb. 20; Di Stasio *et al.*, 2009). Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von Kpp2 und Kpp6 den Virulenz-Phänotyp von *sho1* und *msb2* Mutanten aufheben kann, wurde *rok1* im  $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 Hintergrund deletiert. In Pathogenitätstests zeigte sich, dass die Dreifachmutante eine zu SG200 vergleichbare Virulenz aufwies und es somit zu einer vollständigen Suppression des Virulenzphänotyps der *sho1/msb2* Doppelmutante kam (Abb. 20).

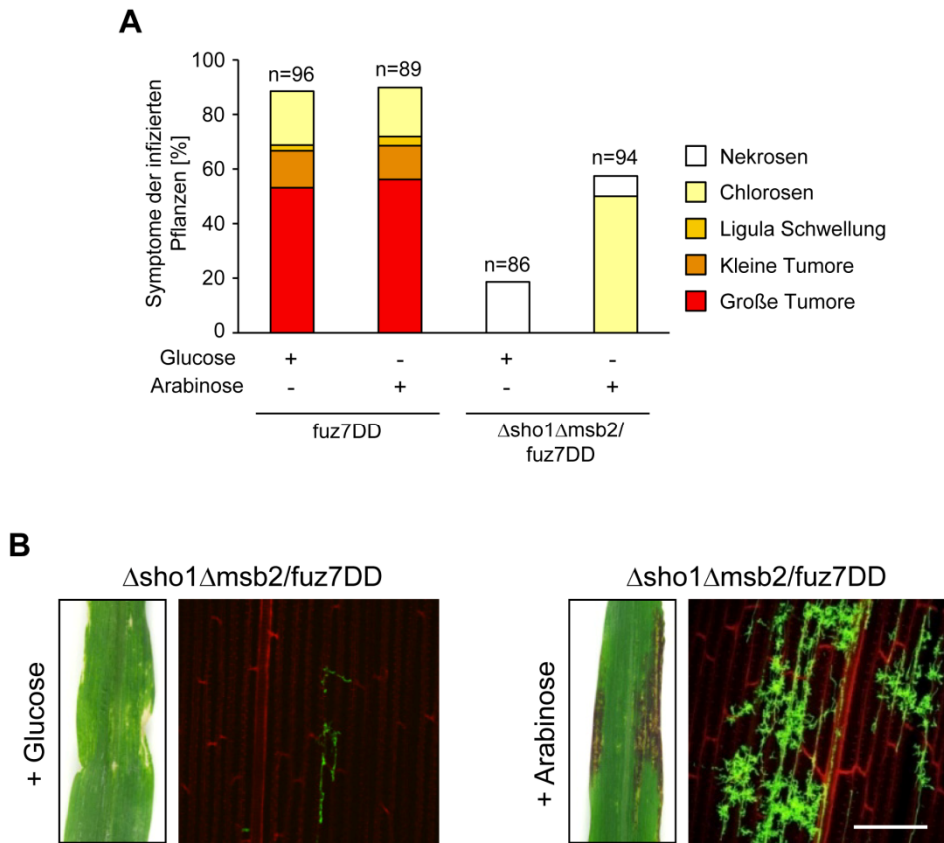


**Abb. 20: Die Deletion von *rok1* supprimiert den Virulenz Phänotyp von SG200Δsho1Δmsb2.** Die angegebenen Stämme wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, quantifiziert. Die Legende für die verschiedenen Symptome ist rechts gezeigt und die Anzahl der infizierten Pflanzen (n) ist über den einzelnen Säulen angegeben.

### 2.7.2 Expression von *fuz7DD* supprimiert den Penetrationsdefekt von SG200Δsho1Δmsb2

Die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 werden durch die MAPK-Kinase Fuz7 aktiviert (Müller *et al.*, 2003b; Di Stasio *et al.*, 2009). Um zu bestätigen, dass sich der Virulenzverlust von Δsho1Δmsb2 Mutanten auf der Ebene der MAP-Kinasen supprimieren lässt, wurde das konstitutiv aktive *fuz7DD*-Allel (Müller *et al.*, 2003b) unter Kontrolle des Arabinose induzierbaren *crg1* Promotors in den *ip*-Locus von SG200 und SG200Δsho1Δmsb2 integriert. Die Induktion von *fuz7DD* Expression durch Arabinose führt zu einer Hyperaktivierung der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 (Müller *et al.*, 2003b; Di Stasio *et al.*, 2009). Daher wurden Zellsuspensionen von SG200fuz7DD und SG200Δsho1Δmsb2/fuz7DD vor Infektion von Maispflanzen mit Arabinose versetzt. In Kontrollinfektionen wurde Arabinose durch Glucose ersetzt, was den *crg1* Promotor reprimiert (Bottin *et al.*, 1996).

In Infektionen mit SG200fuz7DD machte es keinen Unterschied, ob dem Inokulum Arabinose oder Glucose zugegeben wurde. In beiden Fällen wurde eine vergleichbare Anzahl Tumore gebildet (Abb. 21A). Nach Infektion mit SG200Δsho1Δmsb2/fuz7DD unter Zugabe von Glucose konnte die Bildung nekrotischer Läsionen beobachtet werden (Abb. 21A). Mikroskopische Analysen zeigten zudem, dass eine Kolonisation des Pflanzengewebes nicht stattgefunden hat (21B, links). Dies entspricht dem Phänotyp der *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutante (vgl. Abb. 10 und 12).



**Abb. 21: Die Expression von *fuz7DD* in SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 führt zu einer erfolgreichen Penetration der Pflanzenoberfläche. (A)** Die Stämme SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2/*fuz7DD* und SG200*fuz7DD* wurden in sieben Tage alte Maispflanzen injiziert. Vor Infektion wurde der jeweiligen Zellsuspension entweder Arabinose, zur Aktivierung der *fuz7DD* Expression, oder Glucose, zur Repression der *fuz7DD* Expression, zugegeben. Die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, quantifiziert. Die Legende für die verschiedenen Symptome ist rechts gezeigt und die Anzahl der infizierten Pflanzen (n) ist über den einzelnen Säulen angegeben. **(B)** Makroskopische und mikroskopische Symptome nach Infektion mit SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2/*fuz7DD* unter Zugabe von Glucose (links) und Arabinose (rechts). Ein repräsentatives Blatt ist jeweils links gezeigt. Konfokale Mikroskopie wurde durchgeführt wie in Abb. 12B beschrieben. Der Längenmaßstab entspricht 50  $\mu$ m.

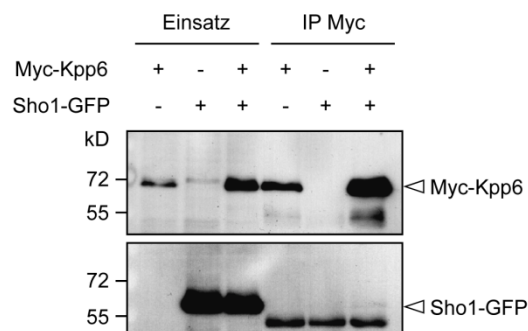
Im Gegensatz zu Glucose, verursachte in Infektionen mit SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2/*fuz7DD* die Zugabe von Arabinose die Bildung von Anthocyan und Chlorosen (Abb. 21A und B, rechts), was auf eine erfolgreiche Penetration der Blattoberfläche hindeutete. Eine mikroskopische Analyse bestätigte, dass nach Induktion von *fuz7DD* durch Arabinose Penetration stattgefunden hat, die sich in einer Kolonisierung des Pflanzengewebes äußerte (Abb. 21B, rechts). Es konnte jedoch keine Tumorbildung beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf eine geringe Arabinosekonzentration im Pflanzengewebe und der damit einhergehenden Deaktivierung des *crg1* Promotors zurückzuführen. Sho1 und Msb2 haben demnach weitere Funktionen innerhalb der Pflanze (vgl. Kapitel 2.5.2), die vermutlich abhängig von Fuz7 sind. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Sho1 und Msb2 eine Funktion oberhalb der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 besitzen.

## 2.8 Die Interaktion von Sho1 mit der MAP-Kinase Kpp6

Vorangegangene Studien konnten Sho1 im Hefe Zwei-Hybrid-System als Interaktionspartner von Kpp6 identifizieren (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a). Im Folgenden wurde diese Interaktion mittels Co-Immunpräzipitation verifiziert. Zudem wurde untersucht, ob Sho1 in der Lage ist mit weiteren MAP-Kinasen zu interagieren. Schließlich wurden die Interaktionsdomänen von Sho1 und Kpp6 mittels Hefe Zwei-Hybrid-System kartiert und die physiologische Relevanz der Interaktion *in vivo* getestet.

### 2.8.1 Sho1 interagiert spezifisch mit Kpp6

Um die Interaktion von Sho1 und Kpp6 zu überprüfen, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Da *kpp6* in axenischer Kultur nicht exprimiert ist (Brachmann *et al.*, 2003), wurde eine N-terminale *myc-kpp6* Fusion unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors in multipler Kopie in den *ip*-Locus von SG200sho1GFP und SG200Δ*kpp6* integriert.

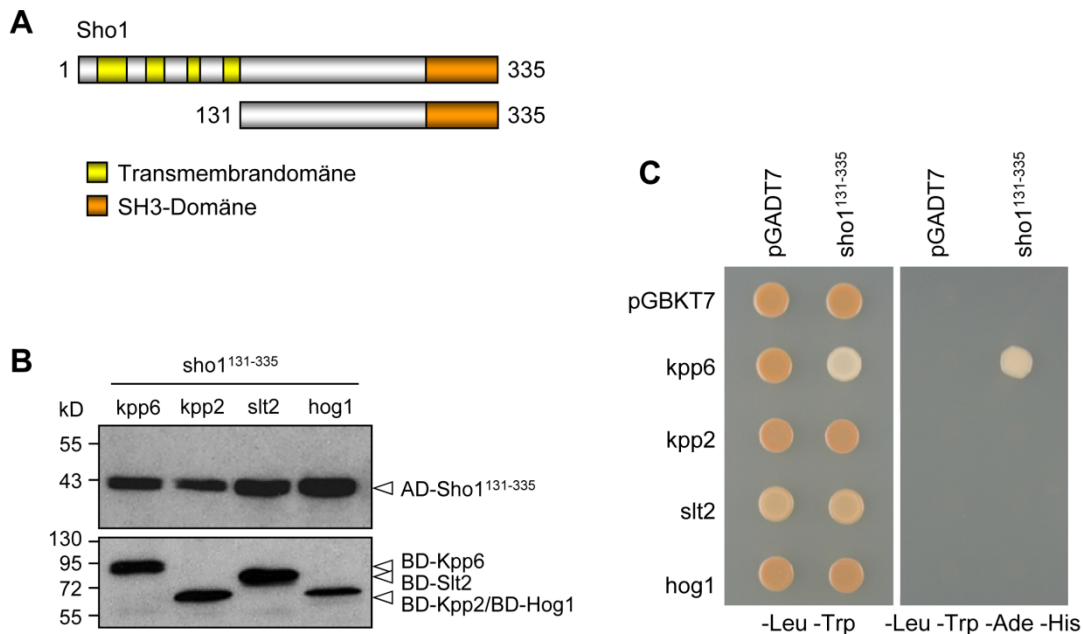


**Abb. 22: Co-Immunpräzipitation von Sho1 und Kpp6.** Myc-Kpp6 und Sho1-GFP wurden wie angegeben in SG200 exprimiert. Der Gesamtzellextrakt (Einsatz) aus exponentiell wachsenden Kulturen wurde für eine Immunpräzipitation mit anti-Myc Antikörpern eingesetzt (IP Myc). Anschließend wurden Western-Analysen mit anti-Myc (oben) und anti-GFP (unten) Antikörperen durchgeführt. Sho1-GFP co-präzipitierte schwach mit Myc-Kpp6. Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an und der Größenstandard ist links angegeben.

Antikörper gegen das Myc-Epitop wurden benutzt, um Myc-Kpp6 zu präzipitieren. Im Stamm SG200sho1GFP/*kpp6*-mc führte dies zu einer schwachen Co-Präzipitation von Sho1-GFP (Abb. 22). Die Präzipitation von Sho1-GFP war abhängig von Myc-Kpp6, da im Kontrollstamm SG200sho1GFP nach Präzipitation kein Sho1-GFP detektiert werden konnte (Abb. 22). Somit wurde die Interaktion von Sho1 und Kpp6 *in vivo* nachgewiesen.

Im Anschluss wurde getestet, ob Sho1 auch mit den MAP-Kinasen Kpp2, Hog1 (Um02375) und Slr2 (Um10107) interagiert. Dafür wurde das Hefe Zwei-Hybrid-System

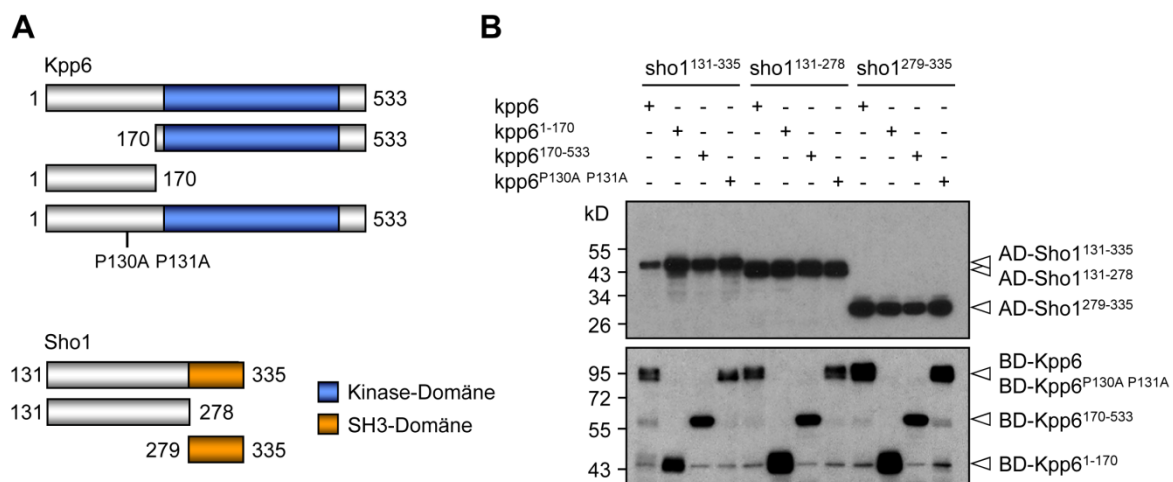
verwendet. Für diese Analyse wurde ein verkürztes Allel von Sho1 ohne Transmembrandomänen eingesetzt (Abb. 23A). Der für Aminosäuren 131 - 335 codierende Bereich von *sho1* wurde in den Beutevektor pGADT7 integriert. Als Ködervektoren wurden pGBKT7-kpp6, pGBKT7-kpp2, pGBKT7-hog1 und pGBKT7-slt2 verwendet (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a). Nach Co-Transformation von pGADT7-sho1<sup>131-335</sup> und des jeweiligen pGBKT7 Derivats in AH109 zeigten alle Stämme eine vergleichbare Expression der jeweiligen MAP-Kinase (Abb. 23B). Während auf Selektionsmedium (-Leu -Trp) alle Stämme in der Lage waren zu wachsen, konnte auf Hochstringenzmedium (-Leu -Trp -Ade -His) nur der Stamm wachsen, der mit pGADT7-sho1<sup>131-335</sup> und pGBKT7-kpp6 transformiert wurde (Abb. 23C). Damit interagiert Sho1 spezifisch mit der MAP-Kinase Kpp6.



**Abb. 23: Test auf Interaktion von Sho1 mit weiteren MAP-Kinasen.** (A) Schematische Darstellung von Sho1 und dem verkürzten Sho1<sup>131-335</sup> Protein. Die Länge der Proteine ist in Aminosäuren angegeben. (B) Der *S. cerevisiae* Stamm AH109 wurde mit pGADT7-sho1<sup>131-335</sup> und den angegebenen pGBKT7 Derivaten co-transformiert. In Western-Analysen wurde mittels Antikörpern gegen die Gal4-Aktivierungsdomäne die Expression von AD-Sho1<sup>131-335</sup> nachgewiesen (oben). Antikörper gegen die Gal4-Bindedomäne führten zum Nachweis der Expression der getesteten MAP-Kinasen (unten). Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an und der Größenstandard ist links angegeben. (C) Nach Co-Transformation der angegebenen pGADT7 und pGBKT7 Derivate in AH109, wurden Kulturen der entsprechenden Transformanten auf Selektionsmedium (-Leu -Trp) und Hochstringenzmedium (-Leu -Trp -Ade -His) getropft. Platten wurden für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

## 2.8.2 Identifizierung der Interaktionsdomänen von Sho1 und Kpp6

Im nächsten Schritt sollten die Interaktionsdomänen von Sho1 und Kpp6 identifiziert werden. Verschiedene Fragmente von Sho1 und Kpp6 (Abb. 24A) wurden auf ihre Fähigkeit zur Interaktion überprüft. Da Kpp6 eine für MAP-Kinasen untypische N-terminale Domäne enthält (Brachmann *et al.*, 2003), wurde die für Aminosäuren 1 - 170 codierende Region sowie die für die Kinase-Domäne (Aminosäuren 170 - 533) codierende Region von *kpp6* in pGBKT7 integriert. Bezüglich *sho1* wurde der für die SH3-Domäne (Aminosäuren 279 - 335) codierende Bereich sowie die Linker Region (Aminosäuren 131 - 278), die zwischen der vierten Transmembrandomäne und der SH3-Domäne liegt, in pGADT7 integriert.

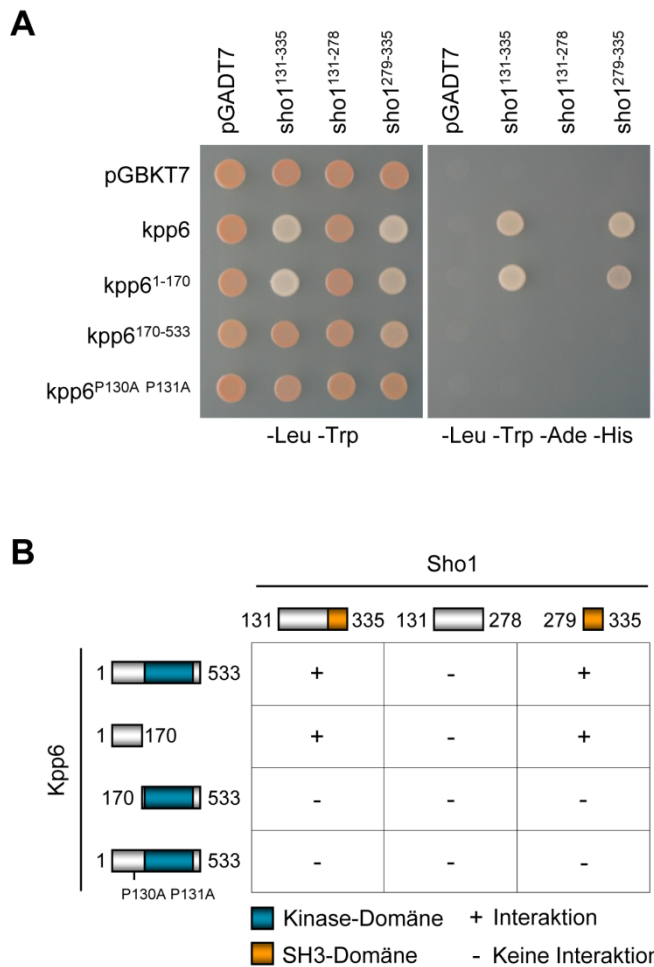


**Abb. 24: Expressionsnachweis der für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse eingesetzten Sho1 und Kpp6 Proteine.** (A) Schematische Darstellung der verkürzten Sho1 und Kpp6 Proteine und des PRD-mutierten Kpp6<sup>P130A P131A</sup>-Allels. (B) Der *S. cerevisiae* Stamm AH109 wurde mit den oben angegebenen pGADT7 Derivaten und den links angegebenen pGBKT7 Derivaten co-transformiert. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde durch Western-Analysen mit Antikörpern gegen die Gal4-Aktivierungsdomäne (oben) und Antikörpern gegen die Gal4-Bindedomäne (unten) nachgewiesen. Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine an und der Größenstandard ist links angegeben.

Die Co-Transformation der pGBKT7 und pGADT7 Derivate zeigte, dass alle Allele von Sho1 und Kpp6 exprimiert wurden (Abb. 24B). Wachstumstests auf Hochstringenzmedium (-Leu -Trp -Ade -His) zeigten, dass die SH3-Domäne von Sho1 ausreichend ist, um eine Interaktion mit Kpp6 zu vermitteln (Abb. 25). In Kpp6 konnte der N-Terminus als Interaktionsdomäne identifiziert werden (Abb. 25). SH3-Domänen interagieren in der Regel mit prolinreichen Domänen (PRD; Li, 2005). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde im N-Terminus von Kpp6 das Motiv KPLPPSP (Aminosäuren 127 - 133) identifiziert, das einer Typ I PRD entspricht (R/KxxPxxP; Li, 2005). Um die Rolle dieses Motivs für die



Interaktion mit Sho1 zu testen, wurden zwei Prolinreste innerhalb des Motivs durch Alanin substituiert (KPLAASP). Das entstandene *kpp6*<sup>P130A P131A</sup>-Allel wurde in die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse mit einbezogen. Obwohl die Mutationen keinen Einfluss auf die Expression des Mutantenproteins in Hefe hatten (Abb. 24B), war eine Interaktion mit der SH3-Domäne von Sho1 nicht mehr möglich (Abb. 25). Die Ergebnisse zeigen, dass die SH3-Domäne von Sho1 mit einer Typ I PRD im N-Terminus von Kpp6 interagiert.



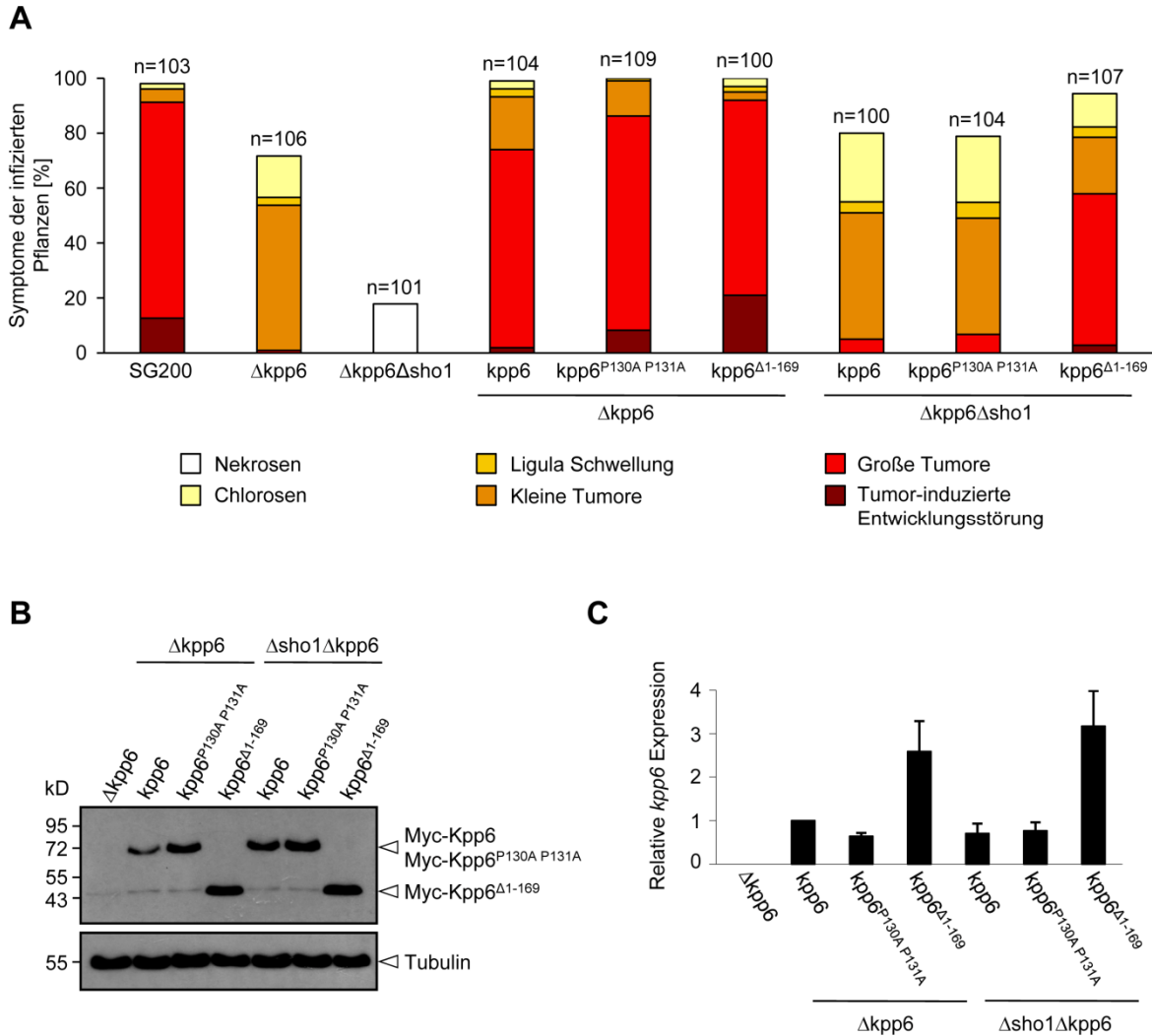
**Abb. 25: Kartierung der Interaktionsdomänen von Sho1 und Kpp6. (A)** Der *S. cerevisiae* Stamm AH109 wurde mit den oben angegebenen pGADT7 Derivaten und den links angegebenen pGBKT7 Derivaten co-transformiert. Es wurden Zellsuspensionen der entsprechenden Transformanten auf Selektionsmedium (-Leu -Trp) und Hochstringenzmedium (-Leu -Trp -Ade -His) getropft. Platten wurden für zwei Tage bei 28°C inkubiert. **(B)** Schematische Zusammenfassung der in B beschriebenen Hefe Zwei-Hybrid-Analyse.

### 2.8.3 Auswirkung der Sho1/Kpp6 Interaktion auf die pathogene Entwicklung

Um die biologische Relevanz der Interaktion zwischen Sho1 und Kpp6 zu prüfen, wurde das N-terminal verkürzte *kpp6*<sup>Δ1-169</sup>-Allel sowie das *kpp6*<sup>P130A P131A</sup>-Allel in *U. maydis*



exprimiert. Aufgrund der komplexen Regulation von *kpp6* auf transkriptioneller Ebene (Brachmann, 2001) wurden beide *kpp6*-Allele sowie Wildtyp *kpp6* als N-terminale *myc*-Epitop Fusionen unter die Kontrolle des konstitutiven *otef* Promotors gestellt und in Einzelkopie in den *ip*-Locus von SG200 $\Delta$ *kpp6* integriert. Anschließend wurde die Virulenz dieser Stämme getestet.



**Abb. 26: Auswirkung der Sho1/Kpp6 Interaktion auf die Virulenz von *U. maydis*.** (A) Wildtyp *kpp6*, *kpp6*<sup>P130A P131A</sup> und *kpp6*<sup>Δ1-169</sup> wurden konstitutiv als N-terminale *myc*-Epitop Fusionen in SG200 $\Delta$ *kpp6* bzw. SG200 $\Delta$ *sho1* $\Delta$ *kpp6* exprimiert. Nach Infektion von Maispflanzen mit den angegebenen SG200 Derivaten wurden die Symptome der Pflanzen, wie in Abb. 10 beschrieben, quantifiziert. Die Legende für die Symptome sowie die Anzahl der jeweils infizierten Pflanzen (n) ist angegeben. (B) Von axenischen Kulturen der angegebenen SG200 Derivate wurden Proteinextrakte hergestellt. In Western-Analysen wurden die verschiedenen Myc-Kpp6 Proteine durch anti-Myc Antikörper nachgewiesen. Tubulin diente als Ladekontrolle und wurde mit anti-Tubulin Antikörpern detektiert. Pfeilspitzen geben die detektierten Proteine an und der Größenstandard ist links gezeigt. (C) Quantitative Analyse der *kpp6* Expression. Aus axenischen Kulturen der angegebenen SG200 Derivate wurde die RNA isoliert und eine qPCR mit *kpp6*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Als Referenz diente konstitutiv exprimiertes *ppi* (*peptidylprolyl isomerase*). Die relative Expression von *kpp6* in SG200 $\Delta$ *kpp6*/*kpp6* wurde gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt und Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die Expression von *kpp6* konnte den Virulenzphänotyp von SG200 $\Delta$ *kpp6* nicht vollständig komplementieren (Abb. 26A). Die Expression von *kpp6*<sup>P130A P131A</sup> hingegen führte zu einer nahezu vollständigen Komplementation und die Expression von *kpp6* <sup>$\Delta$ 1-169</sup> erhöhte die Virulenz im Vergleich zu Stämmen, die *kpp6*<sup>P130A P131A</sup> exprimierten, nochmals (Abb. 26A). Um zu überprüfen, ob die virulenz erhöhenden Effekte von Kpp6<sup>P130A P131A</sup> und Kpp6 <sup>$\Delta$ 1-169</sup> abhängig von Sho1 sind, wurden die verschiedenen *kpp6*-Allele auch in SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ *kpp6* exprimiert. Im apathogenen SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ *kpp6* Stamm führte die Expression von *kpp6* und *kpp6*<sup>P130A P131A</sup> zu einer vergleichbaren Komplementation (Abb. 26A). Wenn das *kpp6* <sup>$\Delta$ 1-169</sup>-Allel eingebracht wurde, konnte eine, im Vergleich zu  $\Delta$ sho1 $\Delta$ *kpp6* Stämmen, die *kpp6* oder *kpp6*<sup>P130A P131A</sup> exprimierten, erhöhte Virulenz beobachtet werden (Abb. 26A). Diese Ergebnisse zeigen, dass der N-Terminus von Kpp6 eine negative Funktion für die pathogene Entwicklung besitzt, die partiell abhängig von Sho1 ist.

In einer Western-Analyse wurden die Proteinmengen der verschiedenen Myc-Kpp6-Allele bestimmt. Dabei zeigte sich, dass im  $\Delta$ *kpp6* Hintergrund die Proteinmenge von Kpp6<sup>P130A P131A</sup> im Vergleich zu Kpp6 wesentlich höher war (Abb. 26B). Im  $\Delta$ sho1 $\Delta$ *kpp6* Hintergrund hingegen waren die Proteinmengen von Kpp6<sup>P130A P131A</sup> und Kpp6 vergleichbar und entsprachen der Menge von Kpp6<sup>P130A P131A</sup> im  $\Delta$ *kpp6* Hintergrund (Abb. 26B). Im Vergleich zu Kpp6<sup>P130A P131A</sup> und Kpp6 war die Proteinmenge von Kpp6 <sup>$\Delta$ 1-169</sup> unabhängig vom Stammhintergrund nochmals erhöht (Abb. 26B). Da die unterschiedlichen Proteinmengen in den verschiedenen Stämmen das Resultat transkriptioneller Unterschiede sein könnte, wurde eine qPCR durchgeführt. Die relativen Expressionen von *kpp6* und *kpp6*<sup>P130A P131A</sup> waren vergleichbar und auch der Stammhintergrund hatte keinen Einfluss auf die Transkriptmengen (Abb. 26C). Die relative Expression von *kpp6* <sup>$\Delta$ 1-169</sup> hingegen war unabhängig vom Stammhintergrund erhöht (Abb. 26C), was die erhöhten Proteinmengen von Kpp6 <sup>$\Delta$ 1-169</sup> teilweise erklären könnte. Dies zeigt, dass der N-Terminus von Kpp6 negative Auswirkungen auf die Transkript- und Proteinmengen von Kpp6 hat. Es ist weiterhin vorstellbar, dass die Interaktion von Sho1 mit dem N-Terminus von Kpp6 die Stabilität des Kpp6 Proteins verringert.

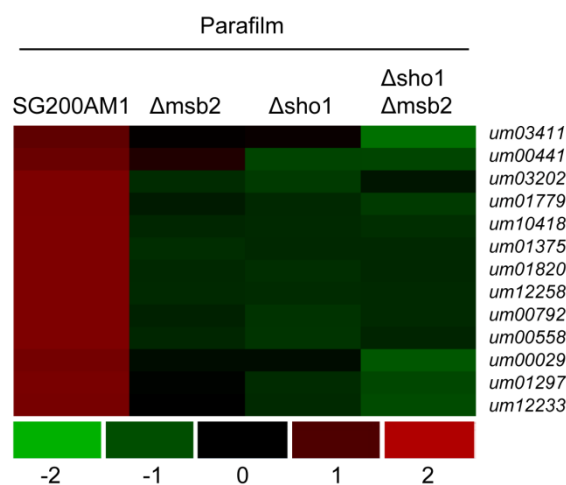
## 2.9 Transkriptomanalysen von *sho1* und *msb2* Mutanten

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass *sho1* und *msb2* Mutanten zwar filamentös wachsen können, die Bildung von Appressorien jedoch unterbunden ist. Um den Einfluss von Sho1 und Msb2 auf die Genexpression während der Appressorienbildung zu untersuchen wurden vergleichende Transkriptomanalysen von SG200AM1, SG200AM1 $\Delta$ sho1, SG200AM1 $\Delta$ msb2 und SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 durchgeführt. Da der Phänotyp der *sho1* und *msb2* Mutanten bezüglich der Appressorienbildung bereits auf der hydrophoben Oberfläche ohne Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren ersichtlich war, wurden Zellen 12 h auf Parafilm inkubiert, was die Bildung von Filamenten erlaubte und in SG200AM1 zu einer Appressorienbildungsrate von 5% führte (nicht gezeigt). Außerdem wurden SG200AM1 und SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 unter Zugabe von HPS auf Parafilm inkubiert, was in SG200AM1 nach 12 h zu einer Appressorienbildungsrate von 20% führte (nicht gezeigt). Diese Bedingungen sollten eine genomweite Analyse der Sho1- und Msb2-abhängigen Genexpression in Appressorien erlauben. Die Transkriptomanalyse erfolgte mittels Affymetrix Microarrays, die über 90% der vorhergesagten ORFs (*open reading frames*) des *U. maydis* Genoms abdecken (Kämper *et al.*, 2006). Je Bedingung und Stamm wurden drei biologische Replikate angefertigt. Differentiell regulierte Gene wurden als signifikant betrachtet, wenn sie mindestens eine zweifache Änderung ihrer Expression zeigten, die Differenz der absoluten Expressionswerte > 20 betrug und die Irrtumswahrscheinlichkeit bei einem p-Wert von < 0,05 lag.

### 2.9.1 Deletionen von *sho1* und *msb2* haben ähnliche Auswirkungen auf die Genexpression

Nach 12 h Inkubation auf Parafilm ergab die Transkriptomanalyse, dass in SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 nur zwölf Gene im Vergleich zur SG200AM1 Referenz nach den oben benannten Kriterien differentiell reguliert waren (siehe Anhang, Tab. 9). In SG200AM1 $\Delta$ sho1 waren elf Gene, und in SG200AM1 $\Delta$ msb2 sechs Gene im Vergleich zu SG200AM1 differentiell reguliert (siehe Anhang, Tab. 10 und 11). Mit Ausnahme von *um03202*, welches im  $\Delta$ sho1 Hintergrund differentiell reguliert war, waren alle Gene, die in den *sho1* und *msb2* Einzeldelentionsmutanten differentiell reguliert waren auch in der *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutante differentiell reguliert, und alle sechs Gene, die in der

$\Delta msb2$  Mutante differentiell reguliert waren, wurden auch in der  $\Delta sho1$  Mutante differentiell reguliert. Somit konnten insgesamt 13 Gene identifiziert werden, die in Abhängigkeit von Sho1 und Msb2 reguliert sind. Interessanterweise waren alle 13 Gene in den *sho1* und *msb2* Mutanten im Vergleich zu SG200AM1 reprimiert. Eine hierarchische Cluster-Analyse dieser 13 Gene mittels des Programms dChip (Li und Hung Wong, 2001) veranschaulicht, dass die Deletion von *sho1* eine ähnliche Auswirkung auf die Genexpression hat wie die Deletion von *msb2* und die Doppeldeletion beider Gene diesen Effekt weiter verstärkt (Abb. 27). Eine nähere Betrachtung der differentiell regulierten Gene wird im folgenden Kapitel vorgenommen.



**Abb. 27: Hierarchische Cluster-Analyse von Sho1- und Msb2-abhängig regulierten Genen nach 12 h Inkubation auf Parafilm.** SG200AM1 und die angegebenen Derivate wurden für 12 h auf Parafilm inkubiert. Von den adhäsiven Filamenten wurde eine vergleichende Transkriptom-analyse durchgeführt. Es wurden alle 13 Gene herausgefiltert, die entweder in *sho1* bzw. *msb2* Einzeldelentionsmutanten oder in *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutanten eine, im Vergleich zu SG200AM1, signifikante Variation ihrer Expression zeigten. Durch Verwendung des Programms dChip (Li und Hung Wong, 2001) wurde eine hierarchische Cluster-Analyse dieser Gene durchgeführt. Die Expressionswerte, die über dem durchschnittlichen Expressionswert des jeweiligen Gens liegen sind rot dargestellt während Expressionswerte, die unter dem durchschnittlichen Expressionswert liegen, grün dargestellt sind (Eisen *et al.*, 1998). Die um Nummern (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) der jeweiligen Gene sind rechts angegeben.

## 2.9.2 *sho1* und *msb2* werden für die Expression sekretierter Effektoren benötigt

Nach 12 h Inkubation auf Parafilm unter Zugabe von HPS ergab die Transkriptomanalyse, dass in SG200AM1 $\Delta sho1\Delta msb2$  60 Gene im Vergleich zu SG200AM1 eine signifikant veränderte Expression zeigten (Abb. 28; siehe Anhang, Tab. 12). Mit Ausnahme von *um03411* und *um00029* wurden alle Gene wiedergefunden, die bereits auf Parafilm ohne Zugabe von HPS in *sho1* und *msb2* Mutanten differentiell reguliert waren. Eine

hierarchische Cluster-Analyse der 60 differentiell regulierten Gene zeigt, dass diese Gene ein ähnliches Expressionsprofil aufwiesen und alle 60 Gene in der  $\Delta sho1\Delta msb2$  Mutante im Vergleich zu SG200AM1 schwächer exprimiert waren (Abb. 28). Interessanterweise handelte es sich bei 58 der 60 Gene um solche, die in SG200AM1 entweder durch Oberflächenkontakt oder durch zusätzliche HPS Stimulation, d.h. unter Appressorien-induzierenden *in vitro* Bedingungen, hochreguliert werden (P. Berndt, D. Lanver und R. Kahmann, nicht publiziert; siehe Anhang, Tab. 12).

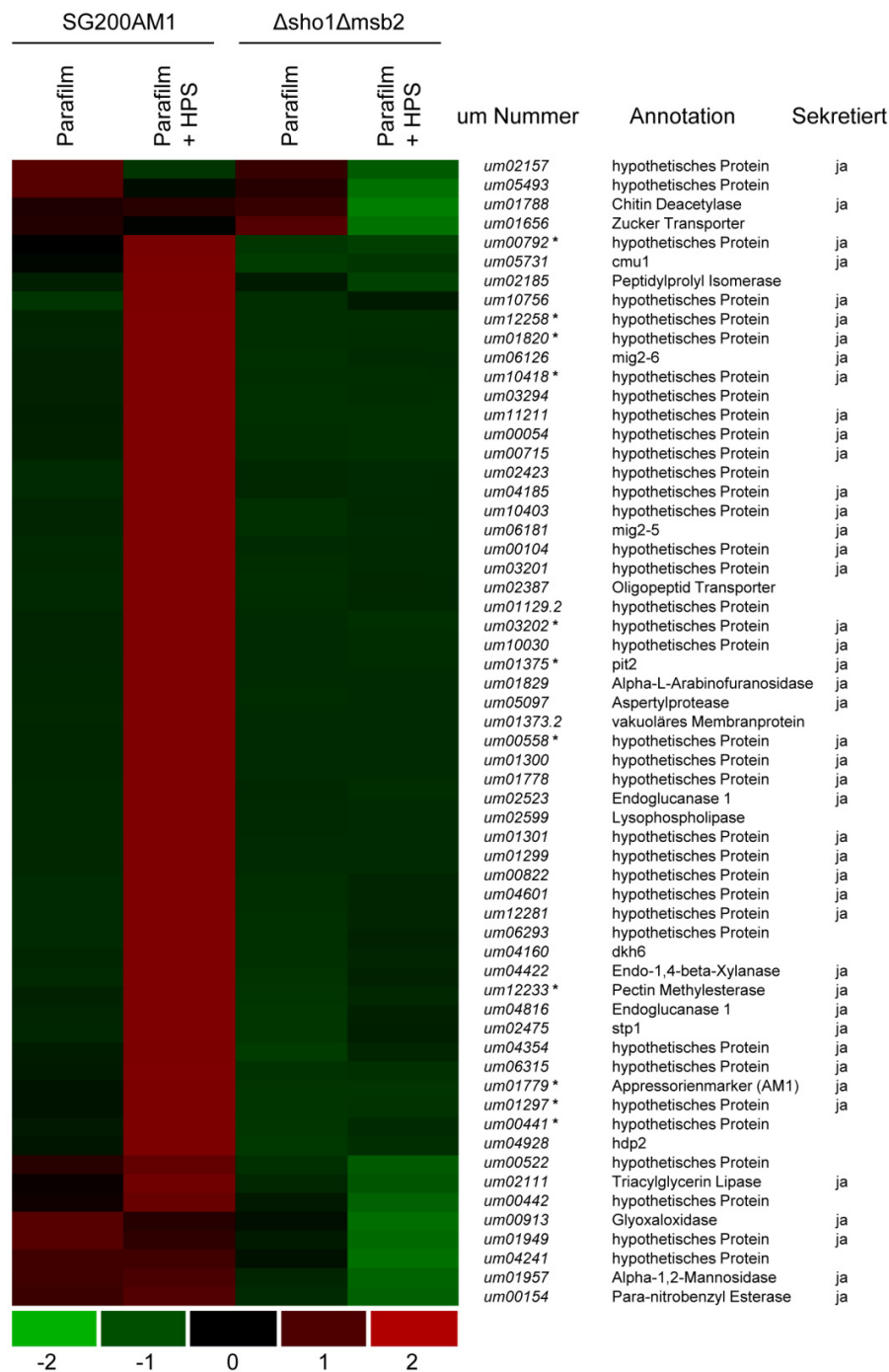
Eine Unterteilung der *sho1*- und *msb2*-abhängig regulierten Gene in funktionelle Kategorien wurde mittels FunCatDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) durchgeführt. Hierbei wurde die Anreicherung einer Kategorie als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei einem p-Wert von  $< 0,005$  lag. Diese Analyse ergab eine Anreicherung im Polysaccharid Metabolismus und im extrazellulären Metabolismus sowie eine Anreicherung für Polysaccharid-bindende Proteine (Tab. 1). Die größte angereicherte Kategorie nach FunCatDB umfasste nicht klassifizierte Proteine.

**Tab. 1: Unterteilung der *sho1*- und *msb2*-abhängig regulierten Gene in funktionelle Kategorien.**

Funktionelle Kategorie	Regulierte Gene	Anteil in regulierten Genen [%]	Anteil im Genom [%]	Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert)
Polysaccharid Metabolismus <sup>1</sup>	8	13,3	2,8	2,3E-04
Extrazellulärer Metabolismus <sup>1</sup>	3	5,0	0,6	4,3E-03
Polysaccharid bindende Proteine <sup>1</sup>	4	6,7	0,6	3,2E-04
Nichtklassifizierte Proteine <sup>1</sup>	37	61,6	33,8	8,6E-06
Sekretierte Proteine	44	73,3	8,0	5,4E-36

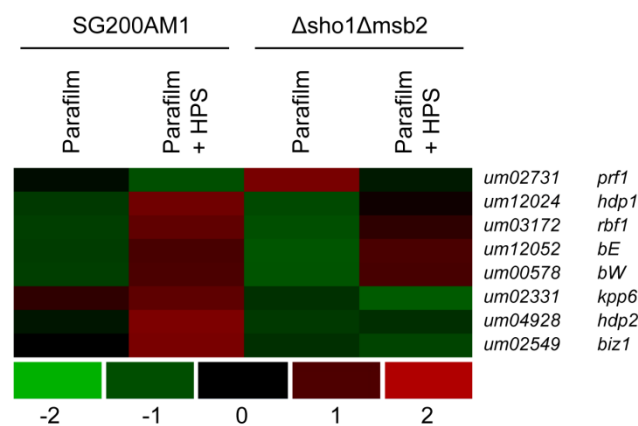
<sup>1</sup> Analyse nach FunCatDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>)

*U. maydis* codiert für 554 putativ sekretierte Proteine, was einem Anteil im Genom von 8% entspricht (Müller *et al.*, 2008). Bemerkenswerterweise codieren 44 der 60 *sho1*- und *msb2*-abhängig regulierten Gene für putativ sekretierte Proteine (Abb. 28 und Tab. 1). Im Vergleich zum Genom entspricht dies einer neunfachen Anreicherung. Einige der *sho1*- und *msb2*-abhängig regulierten Gene codieren für sekretierte pathogenitätsrelevante Effektoren wie beispielsweise *stp1* (K. Schipper, pers. Mitteilung), *pit2* (G. Doehlemann, pers. Mitteilung) oder *cmu1* (A. Djamei, pers. Mitteilung).



**Abb. 28: Hierarchische Cluster-Analyse von Sho1- und Msb2-abhängig regulierten Genen nach 12 h Inkubation auf Parafilm mit HPS.** SG200AM1 und SG200AM1Δsho1Δmsb2 wurden für 12 h auf Parafilm mit HPS inkubiert. Die Transkriptomanalyse ergab, dass im Vergleich zu SG200AM1 60 Gene in SG200AM1Δsho1Δmsb2 signifikant differentiell reguliert waren. Anhand dieser Gene wurde eine hierarchische Cluster-Analyse durchgeführt, bei der auch die Expressionswerte bei Inkubation auf Parafilm ohne Zugabe von HPS miteinbezogen wurden. Die relative Expressionsstärke der einzelnen Gene ist durch Farben gekennzeichnet, wie in Abb. 27 beschrieben. Die um Nummer (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>), der Name bzw. die annotierte Funktion (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) des jeweiligen Gens sowie das Vorhandensein eines putativen Signalpeptids (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ist rechts angegeben. \*Diese Gene waren im Vergleich zu SG200AM1 bereits auf Parafilm ohne Zugabe von HPS in SG200AM1Δsho1Δmsb2 signifikant differentiell reguliert (vgl. Abb. 27).

Viele *U. maydis* Effektoren sind in Genclustern angeordnet (Kämper *et al.*, 2006). Neben *stp1*, welches Teil des Clusters 5B ist, wurden alle drei Gene des Clusters 8A (*um03201*, *um03202*, *um10403*), vier Gene des Clusters 2B (*um01297*, *um01299*, *um01300*, *um01301*) sowie *mig2-5* aus dem *mig* Cluster gefunden (Basse *et al.*, 2002). Außerdem ist beachtenswert, dass neben *um01779*, dessen Promotor als Appressorienmarker (AM1) dient, auch das benachbarte Gen (*um01778*), welches auch für ein putativ sekretiertes Protein codiert, im  $\Delta sho1\Delta msb2$  Hintergrund kaum exprimiert wurde. Die Gene *um12258* und *um10418* sind ebenfalls benachbart, codieren für potentiell sekretierte Effektoren und benötigen *sho1* und *msb2* für ihre Expression.



**Abb. 29: Vergleich der Expressionsprofile von Komponenten der *b*-Kaskade in SG200AM1 und SG200AM1 $\Delta sho1\Delta msb2$ .** Gezeigt ist eine hierarchische Cluster-Analyse von Komponenten der *b*-Kaskade. Die oben angegebenen Stämme und Bedingungen wurden in der Analyse berücksichtigt. Die relative Expressionsstärke der einzelnen Gene ist durch Farben gekennzeichnet, wie in Abb. 27 beschrieben.

Unter den 60 deregulierten Genen fand sich auch ein transkriptioneller Regulator, *hdp2*, welcher für ein Homeodomänen Protein codiert (Heimel *et al.*, 2010). Zusammen mit *hdp1*, *biz1* und *kpp6* gehört *hdp2* zu den Rbf1-abhängig regulierten Genen (Heimel *et al.*, 2010). Da die Transkription von *rbf1* direkt über das bE/bW Heterodimer gesteuert ist (Heimel *et al.*, 2010), erschien es interessant, die Genexpression dieser Schlüsselfaktoren im Hintergrund der *sho1/msb2* Doppeldeletion genauer zu betrachten. Dafür wurde eine hierarchische Cluster-Analyse durchgeführt, in die auch *prf1* mit einbezogen wurden. Bezüglich der Expressionsprofile von *hdp1*, *prf1*, *rbf1*, *bE* und *bW* waren zwischen SG200AM1 und SG200AM1 $\Delta sho1\Delta msb2$  kaum Unterschiede auszumachen (Abb. 29). Das Expressionsprofil von *biz1* und *kpp6* hingegen war dem von *hdp2* sehr ähnlich, d.h. die Expression von *biz1* und *kpp6* war in der  $\Delta sho1\Delta msb2$  Mutante deutlich reduziert (Abb. 29). Es muss allerdings betont werden, dass die reduzierte Expression von *biz1* und

*kpp6* in SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2, verglichen mit SG200AM1, aufgrund der Kriterien, die zur Auswertung der Transkriptomanalyse gewählt wurden (siehe oben), nicht signifikant war. Da Sho1 und Msb2 keinen Einfluss auf die Expression der *b*-Gene haben, greifen sie vermutlich in Prozesse ein, die unterhalb von *b* und *rbf1* liegen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse, dass Sho1 und Msb2 eine wichtige Rolle bei der Expression sekretierter Effektoren spielen und somit *U. maydis* für eine erfolgreiche Penetration der Pflanzenoberfläche vorbereiten.

## 2.10 Prozessierung und Sekretion von Msb2

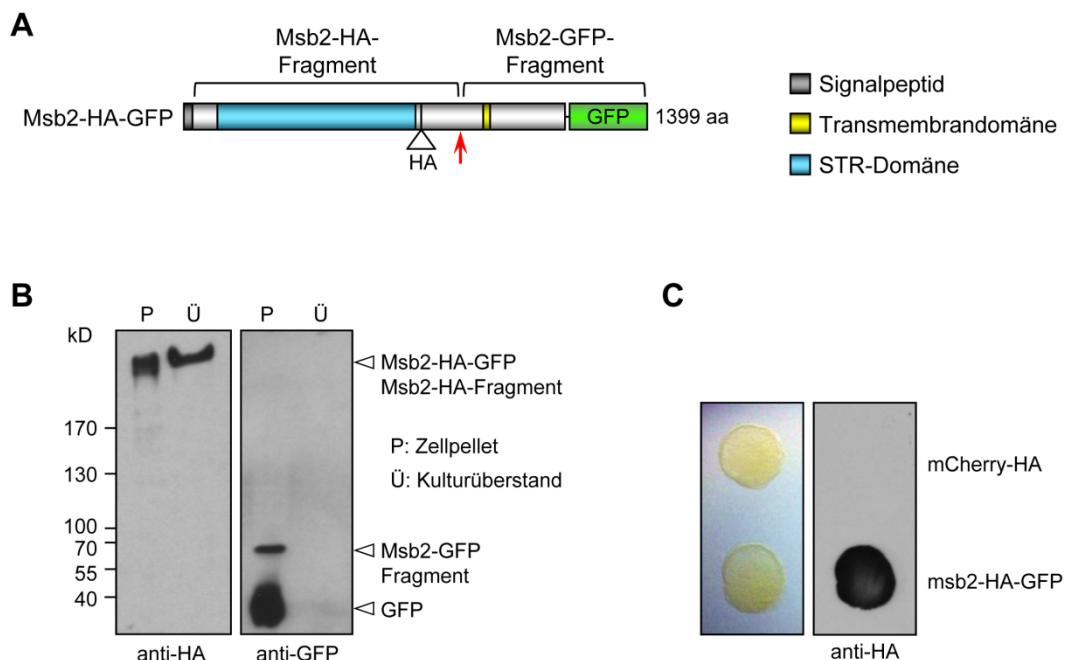
Western-Analysen eines Msb2-mCherry Fusionsproteins (vgl. Abb. 7B) führten zur Detektion eines verkürzten C-terminalen Fragments, was ein Hinweis auf eine Prozessierung von Msb2 sein könnte. Um eine solche Prozessierung und die damit einhergehende potentielle Sekretion des N-Terminus näher zu untersuchen, wurde ein modifiziertes Msb2 Protein (Msb2-HA-GFP) exprimiert, das C-terminal an GFP fusioniert war und zwischen Aminosäure 709 und 710 ein HA-Epitop integriert hatte (Abb. 30A). Damit konnten die C-terminale intrazelluläre Domäne und die N-terminale extrazelluläre Domäne separat voneinander analysiert werden. Obwohl das Msb2 Protein einen potentiellen Rezeptor darstellt, der möglicherweise Signale mit seiner extrazellulären Domäne wahrnimmt und über die intrazelluläre Domäne an Signalkaskaden überträgt, wurde untersucht, ob die beiden Domänen voneinander unabhängige Funktionen besitzen.

### 2.10.1 Msb2 wird prozessiert und sekretiert

Um eine starke Expression von *msb2-ha-gfp* zu gewährleisten, wurde das Konstrukt unter der Kontrolle des *otef* Promotors in den *ip*-Locus von SG200 $\Delta$ msb2 integriert, was zu einer Komplementation des Virulenzphänotyps der  $\Delta$ *msb2* Mutante führte (siehe Anhang, Abb. 37B). Zum Nachweis der Msb2 Sekretion und Prozessierung wurden Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und durch Zentrifugation in eine Zellpellet- und eine Kulturüberstandsfraktion separiert. Anschließend wurden die im Kulturüberstand enthaltenen Proteine mittels TCA-Fällung angereichert. In Western-Analysen des Zellpellets konnte mittels anti-GFP Antikörper ein Fragment von etwa 60 kD detektiert werden, was nach Massenvorhersage der Größe von GFP, der gesamten cytoplasmatischen Domäne, der Transmembrandomäne und einem kleinen Bereich der extrazellulären



Domäne entspricht (Abb. 30B). Mittels anti-HA Antikörper wurde ein Protein nachgewiesen, dass eine Masse von weit über 170 kD besaß (Abb. 30B). Bei dieser Masse vermag das Polyacrylamidgel Unterschiede in einer Größenordnung von 60 kD nicht mehr aufzutrennen, und es konnte daher nicht unterschieden werden, ob es sich bei diesem Protein um das Volllängenprotein handelte oder um eine prozessierte Form. Im Kulturüberstand konnten mit anti-GFP Antikörpern keine Proteine nachgewiesen werden, die Verwendung von anti-HA Antikörpern hingegen führte zur Detektion eines Proteinfragments, das etwa auf der gleichen Höhe lief wie das mittels anti-HA Antikörper detektierte Protein aus dem Zellpellet (Abb. 30B). Dies zeigt, dass der extrazelluläre Teil von Msb2 in den Kulturüberstand sekretiert wurde.



**Abb. 30: Prozessierung und Sekretion von Msb2.** (A) Schematische Darstellung von Msb2-HA-GFP. Der rote Pfeil markiert die potentielle Lage der Spaltstelle (siehe B). Die nach Prozessierung von Msb2-HA-GFP potentiell entstehenden Fragmente sind eingezeichnet. aa: Aminosäuren. (B) SG200Δmsb2/msb2-HA-GFP<sup>con</sup> wurde in CM-Flüssigmedium kultiviert. Es wurden Western-Analysen mit den Proteinen des Zellpellets (P) sowie mit präzipitierten Proteinen aus dem Kulturüberstand (Ü) durchgeführt. Der C-Terminus von Msb2-HA-GFP wurde mit anti-GFP Antikörpern detektiert (rechts) und der N-Terminus von Msb2 konnte mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen werden (links). Pfeilspitzen geben die detektierten Fusionsproteine bzw. Fragmente an und der Größenstandard ist links angegeben. Anhand der Masse des Msb2-GFP-Fragments wurde die Position der potentiellen Spaltstelle in Msb2 abgeschätzt (siehe A). (C) Kolonie-Sekretionstest. SG200mCherry-HA<sup>con</sup> und SG200Δmsb2/msb2-HA-GFP<sup>con</sup> wurden auf Nitrocellulosemembranen kultiviert (links). Die Kolonien wurden abgewaschen und sekretiertes Msb2-HA mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen (rechts).

Um die Sekretion von Msb2 zu verifizieren, wurde ein Kolonie-Sekretionstest durchgeführt. Dafür wurden Zellen auf einer Nitrocellulosemembran kultiviert, was die

anschließende Detektion von sekretierten Proteinen auf der Membran erlaubte. Es zeigte sich, dass die extrazelluläre Domäne von Msb2-HA-GFP aus der Kolonie sekretiert wurde (Abb. 30C). Um Zellyse als Ursache für die Sekretion auszuschließen, wurde ein Kontrollstamm, der cytoplasmatisches mCherry-HA exprimiert, hinzugezogen. Dieser Stamm zeigte keine Sekretion von mCherry-HA (Abb. 30C).



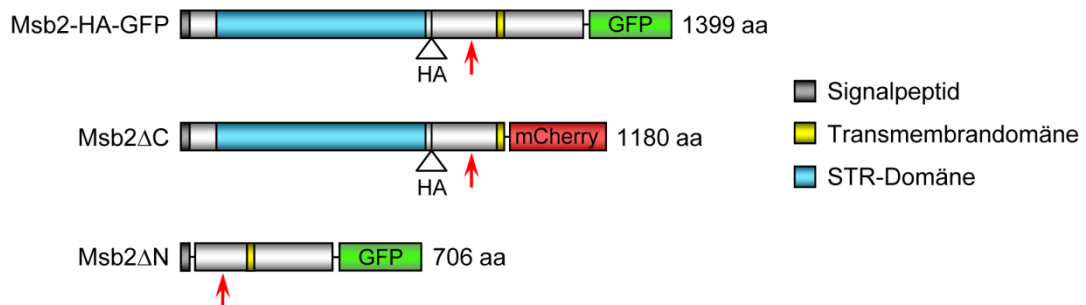
**Abb. 31: Lokalisation der extrazellulären Domäne von Msb2.** Eine Zellsuspension von SG200Δmsb2/msb2-HA-GFP<sup>con</sup> in 2% YEPSL mit 100 μM HPS wurde auf Parafilm gesprüht, und wie in Abb. 17 beschrieben, inkubiert. Pilzhyphen wurden mit CW gefärbt (links) und die N-terminale Domäne von Msb2 mit primären anti-HA Antikörpern aus Maus und sekundären AF488-konjugierten anti-Maus Antikörpern sichtbar gemacht (rechts). Der Längenmaßstab entspricht 10 μm.

Über eine C-terminale mCherry-Fusion konnte bereits gezeigt werden, dass Msb2 transient an der Plasmamembran lokalisiert und in Vakuolen akkumuliert (vgl. Abb. 7A). Zudem konnte eine sehr starke Akkumulation von vakuolärem Msb2 in Appressorien detektiert werden (vgl. Abb. 19). Da diese Lokalisation vermutlich nur auf das prozessierte C-terminale Msb2-Fragment zutrifft, war es interessant, die Lokalisation des extrazellulären Fragments in Appressorien zu untersuchen. Dafür wurden *in vitro* produzierte Appressorien des Stammes SG200Δmsb2/msb2-HA-GFP<sup>con</sup> mit primären anti-HA Antikörpern und AF488-konjugierten sekundären Antikörpern zur Reaktion gebracht. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte ein Signal detektiert werden, dass sich in fleckiger Form in der Peripherie der Filamente befand. Appressorien wiesen die stärksten Signale auf und ältere Abschnitte der Filamente fluoreszierten eher schwach (Abb. 31); zudem konnten Signale detektiert werden, die nicht mit Pilzhyphen assoziiert waren (Abb. 31). Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Pilzhyphen auszuschließen, wurde ein SG200-Kontrollstamm benutzt. In diesem Stamm konnten keine AF488-Fluoreszenzsignale detektiert werden (nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen diese

Ergebnisse, dass Msb2 in eine intra- und eine extrazelluläre Domäne prozessiert wird, wobei das extrazelluläre Fragment zumindest partiell an die Umgebung abgegeben wird.

### 2.10.2 Die intra- und extrazelluläre Domäne von Msb2 werden für die Funktion des Proteins benötigt

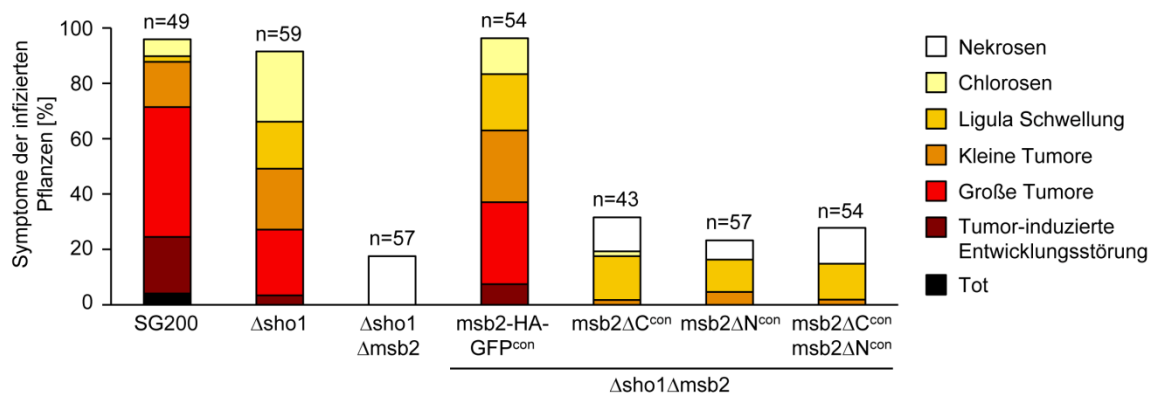
Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die intrazelluläre und die extrazelluläre Domäne wichtig für die Funktion des Msb2 Proteins sind. Dafür wurde zum einen ein Msb2-Allel generiert, das eine Substitution des cytoplasmatischen C-Terminus (Aminosäuren 915 - 1140) gegen mCherry enthielt (Msb2 $\Delta$ C; Abb. 32). Außerdem wurde ein Msb2-Allel verwendet, in dem nahezu die gesamte extrazelluläre Region (Aminosäuren 33 - 713) deletiert war (Msb2 $\Delta$ N; Abb. 32).



**Abb. 32: Schematische Darstellung der C-terminal bzw. N-terminal verkürzten Msb2 Proteine.** Das Msb2-HA-GFP Protein ist oben gezeigt. In Msb2 $\Delta$ C ist die cytoplasmatische Domäne gegen mCherry substituiert (mitte). In Msb2 $\Delta$ N ist die extrazelluläre Domäne deletiert (unten). Beide verkürzten Proteine besitzen das Signalpeptid, die Transmembrandomäne und die potentielle Spaltstelle. Die Länge der jeweiligen Vollängenproteine ist angegeben. aa: Aminosäuren.

Um die Funktionalität dieser *msb2*-Allele zu prüfen, wurden die Deletionskonstrukte sowie das Vollängen-Konstrukt *msb2-ha-gfp* unter der Kontrolle des *otef* Promotors in Einzelkopie in den *ip*-Locus von SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 integriert. Dieser Stamm wurde gewählt, da er sich eignet auch eine geringe Komplementation nachzuweisen. Pathogenitätstests ergaben, dass die Expression von *msb2-ha-gfp* den Virulenzverlust der *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutante komplementieren konnte (Abb. 33). Die Expression von *msb2 $\Delta$ C* oder *msb2 $\Delta$ N* hingegen führte zu einer äußerst schwachen Komplementation; es konnten in beiden Fällen vereinzelt kleine Tumore in infizierten Pflanzen beobachtet werden, die in Infektionen mit SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 nicht auftraten (Abb. 33). Das bedeutet, dass die intra- als auch die extrazelluläre Domäne wichtig für die Funktion von Msb2 sind, die verkürzten Proteine jedoch noch Restaktivität besitzen. In Anbetracht der

Prozessierung von Msb2 war es daher interessant der Frage nachzugehen, ob die gleichzeitige Expression der C-terminal und N-terminal verkürzten Proteine wieder in einem voll funktionstüchtigen Protein resultiert. Es wurde ein *msb2ΔC/msb2ΔN* Doppelkonstrukt unter Kontrolle von *otef* Promotoren in den *ip*-Locus von SG200Δ*sho1Δmsb2* integriert und der resultierende Stamm auf seine Virulenz getestet. Dieser Stamm zeigte jedoch eine ähnlich schwache Pathogenität wie Δ*sho1Δmsb2* Stämme, die *msb2ΔC* oder *msb2ΔN* einzeln exprimierten (Abb. 33).

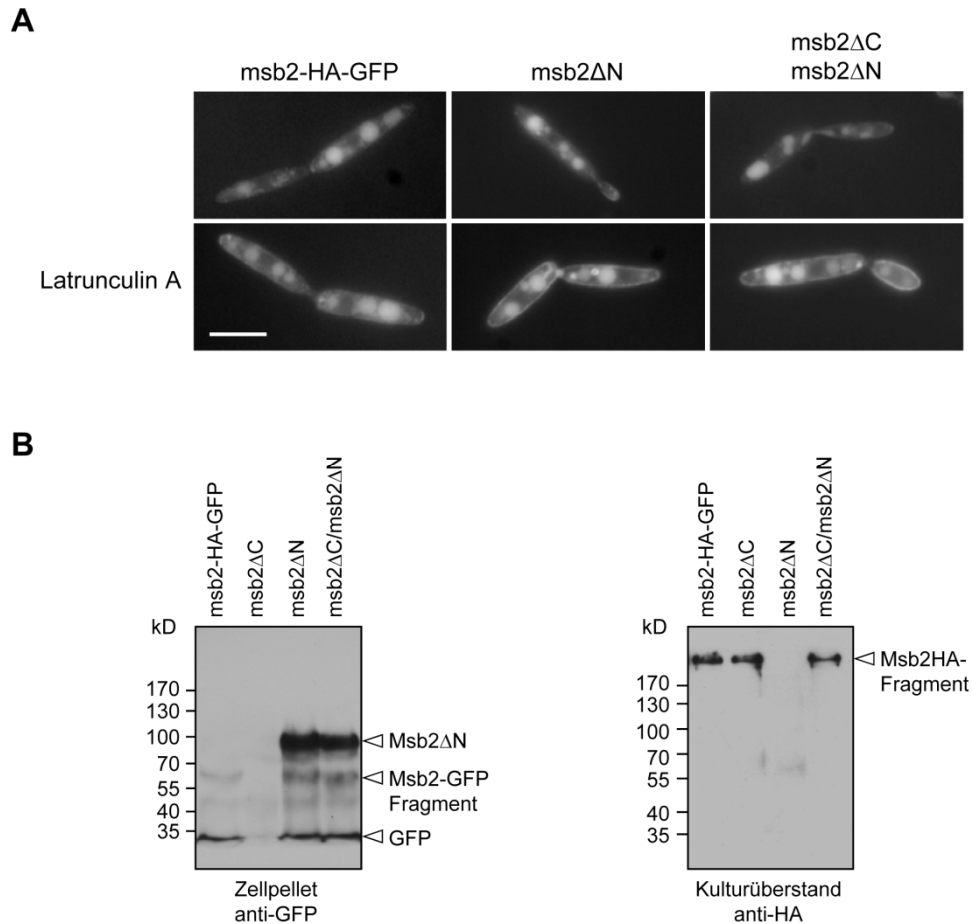


**Abb. 33: Test auf Komplementation von *msb2* Deletionsmutanten mit verkürzten *msb2*-Allelen.** *msb2-ha-gfp*, C-terminal verkürztes *msb2ΔC*, N-terminal verkürztes *msb2ΔN* und ein *msb2ΔC/msb2ΔN* Doppelkonstrukt wurden jeweils konstitutiv in SG200Δ*sho1Δmsb2* exprimiert. Die unter den Säulen angegebenen SG200 Derivate wurden in Maispflanzen injiziert und nach zwölf Tagen die Krankheitssymptome, wie in Abb. 10 beschrieben, ausgewertet. Aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten wurden die Werte gemittelt und prozentual zu der Gesamtzahl der infizierten Pflanzen (n) dargestellt. Die Legende für die verschiedenen Symptome ist rechts gezeigt.

Der beobachtete Funktionsverlust der verkürzten Msb2 Proteine könnte durch Misslokalisierung hervorgerufen worden sein. Zunächst wurde überprüft, ob die N-terminale Deletion von Msb2 die Membranlokalisation beeinflusst. In mikroskopischen Analysen waren die Lokalisationen von Msb2-HA-GFP und Msb2ΔN nicht voneinander zu unterscheiden, und bei Behandlung mit Latrunculin A konnte in beiden Fällen eine Akkumulation des GFP-Signals an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 34A). Eine vergleichbare Lokalisation wurde auch für das mCherry-Signal von Msb2ΔC festgestellt (nicht gezeigt).

Um die Prozessierung von Msb2ΔN nachzuweisen, wurden Western-Analysen durchgeführt. Hierüber gelang die Detektion des 60 kD Fragments (Abb. 34B, links); ein wesentlich stärkeres Signal konnte jedoch auf der Höhe von etwa 90 kD detektiert werden, was die vorhergesagte Masse von 73 kD für das Vollängen Msb2ΔN Protein leicht

übertraf und vermutlich auf Glycosylierung zurückzuführen ist. Um Sekretion der extrazellulären Domäne von Msb2 $\Delta$ C nachzuweisen, wurden Western-Analysen aus Kulturüberständen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine vergleichbare Sekretion der extrazellulären Domänen von Msb2 $\Delta$ C und Msb2-HA-GFP (Abb. 34B, rechts). Es ist daher anzunehmen, dass der Funktionsverlust der verkürzten Msb2 Proteine nicht auf eine fehlerhafte Lokalisation zurückzuführen ist.



**Abb. 34: Lokalisation der verkürzten Msb2 Proteine. (A)** Zellen der angegebenen SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 Derivate wurden während der exponentiellen Wachstumsphase (oben) oder nach Behandlung mit Latrunculin A (unten) mikroskopisch analysiert. Die GFP-Fluoreszenzsignale sind gezeigt. Der Längenmaßstab entspricht 10  $\mu$ m. **(B)** Die angegebenen SG200 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 Derivate wurden in CM-Flüssigmedium kultiviert. Es wurden Western-Analysen mit den Proteinen des Zellpellets (anti-GFP Antikörper; links) sowie mit den präzipitierten Proteinen aus dem Kulturüberstand (anti-HA Antikörper; rechts) durchgeführt. Pfeilspitzen zeigen die detektierten Fusionsproteine bzw. die prozessierten Fragmente an (vgl. Abb. 30 und 32). Der Größenstandard ist links angegeben.

Da bei einer Prozessierung der verkürzten Msb2 Proteine Spaltprodukte entstehen, die bei Prozessierung des Wildtyp Msb2 Proteins nicht entstehen und auch die Volllängenproteine der verkürzten Msb2-Allele in Wildtypzellen nicht vorliegen, wurde überprüft, ob diese

Peptide sich dominant negativ auf die Virulenz von *U. maydis* auswirken. Dazu wurde das *msb2ΔC/msb2ΔN* Doppelkonstrukt in den *ip*-Locus von SG200 integriert und die Virulenz des resultierenden Stammes überprüft. Dabei zeigten SG200 Derivate, die *msb2ΔC* und *msb2ΔN* exprimierten eine zu SG200 vergleichbare Virulenz (siehe Anhang, Abb. 37D). Dies schließt einen dominant negativen Effekt der verkürzten Msb2 Proteine aus.

Die Ergebnisse zeigen, dass die intra- und extrazelluläre Domäne von Msb2 für die Funktion des Proteins benötigt werden. Obwohl das Msb2 Protein prozessiert wird, scheinen die beiden Domänen nur gemeinsam ein funktionelles Protein zu bilden. Eine mögliche Funktion von Msb2 könnte demnach die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere sein.

### 3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Sho1 und Msb2 zwei Plasmamembranproteine charakterisiert, die essentiell für die Virulenz von *U. maydis* sind und oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Kaskade agieren. Die Virulenzdefekte von *sho1* und *msb2* Mutanten konnten auf Defekte in der Appressorienbildung zurückgeführt werden. Sonstige Prozesse wie Stressresistenz, Paarung und filamentöses Wachstum waren nicht signifikant beeinflusst. Sho1 und Msb2 regulieren damit in *U. maydis* spezifisch die Penetration der Pflanzenoberfläche, was sie in *U. maydis* zu Schlüsselkomponenten beim Übergang von saprophytischer zu biotropher Lebensweise macht.

Zunächst erfolgt eine Betrachtung der Phänotypen von *sho1* und *msb2* Mutanten in *U. maydis* sowie eine Einordnung von Sho1 und Msb2 in Signalkaskaden. Dann werden die Funktionen von Sho1 und Msb2 in *U. maydis* durch Vergleiche mit *S. cerevisiae* näher diskutiert und die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass Msb2 als Sensor für Oberflächensignale fungiert. Zuletzt wird auf die aktuellen Kenntnisse über Sho1- und Msb2-orthologe Proteine in anderen Pilzen eingegangen und die Bedeutung von Sho1 und Msb2 für die Virulenz phytopathogener Pilzen diskutiert.

#### 3.1 Sho1 und Msb2 sind an der morphologischen Differenzierung auf Oberflächen beteiligt

Die Pflanzenoberfläche induziert in *U. maydis* die Bildung septierter Filamente und Appressorien. Dieser Entwicklungsschritt kann auf einer hydrophoben Oberflächen *in vitro* nachvollzogen werden, wobei die Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren einen stark stimulierenden Effekt auf die Appressorienbildung hat (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Hydroxy-Fettsäuren alleine induzieren in solopathogenen Stämmen keine Appressorien, sondern die Bildung von Konjugationshyphen-ähnlichen Filamenten, die vollständig mit Cytoplasma gefüllt sind (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Diese Reaktion war in *sho1* und *msb2* Mutanten unverändert, was bedeutet, dass Sho1 und Msb2 nicht an Wahrnehmung und Verarbeitung des Fettsäuresignals beteiligt sind. Auf hydrophoben Oberflächen hingegen zeigte die *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutante eine leicht reduzierte Filamentbildung, die durch Zugabe von HPS erhöht werden konnte. Dies könnte darauf hin deuten, dass der Oberflächenstimulus in dieser Mutante nur abgeschwächt wahrgenommen

wird. Die Fähigkeit zur Appressorienbildung auf hydrophoben Oberflächen war in *sho1/msb2* Doppelmutanten sowie in *sho1* und *msb2* Einzelmутanten nicht vorhanden. Da die hydrophobe Oberfläche das primäre Signal für die Appressorienbildung in *U. maydis* ist (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b), könnte eine unzureichende Perzeption der hydrophoben Oberfläche in *sho1* und *msb2* Mutanten zu einer vollständigen Blockade dieses Entwicklungsschritts führen, die auch durch Zugabe von HPS nicht kompensiert wird. Die *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutante konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine Appressorien bilden. Bemerkenswerterweise waren *sho1* und *msb2* Einzeldelentionsmutanten jedoch in der Lage, mit im Vergleich zum Ausgangsstamm reduzierter Frequenz, Appressorien auf der Pflanzenoberfläche zu bilden. Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren scheinen demnach nicht die alleinigen Stimuli zu sein, die in *U. maydis* Appressorienbildung induzieren.

Eine interessante Beobachtung war, dass die wenigen intrazellulär wachsenden Hyphen der  $\Delta sho1 \Delta msb2$  Mutante Defekte bei der Penetration von Zelle zu Zelle zeigten. Während dieses Vorgangs orientieren sich *U. maydis* Hyphen an den Pflanzenzellwänden und bilden Appressorien-ähnliche Strukturen aus (Doehlemann *et al.*, 2009). Die Pflanzenzellwände stellen somit eine Oberfläche dar, die von *U. maydis* beim Wachstum von Zelle zu Zelle erkannt werden muss. Die Penetrationsdefekte der *sho1/msb2* Doppelmutante innerhalb des Pflanzengewebes könnten somit aus einer abgeschwächten Perzeption dieser Oberfläche resultieren. Da Zellwände wahrscheinlich nicht hydrophob sind, könnten in *sho1/msb2* Doppelmutanten allgemeine Defekte bei der Differenzierung auf Oberflächen vorliegen.

Die Phänotypen von *sho1* und *msb2* Mutanten weisen somit auf eine Funktion von Sho1 und Msb2 in der Oberflächenperzeption hin. Begründet durch diese Ergebnisse und da es sich bei beiden Proteinen um Plasmamembranproteine handelt, könnten sie als Sensoren für Oberflächensignale agieren.

### **3.2 Viele sekretierte CWDEs und Effektoren werden Sho1- und Msb2-abhängig exprimiert**

Transkriptomanalysen ergaben, dass unter Appressorien-induzierenden *in vitro* Bedingungen 60 Gene Sho1 und Msb2 für ihre Expression benötigen. In SG200AM1 wird, verglichen mit einer hydrophilen Glasoberfläche, die Expression von 58 der 60 Gene entweder durch Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche oder der zusätzlichen Zugabe



von HPS induziert (P. Berndt, D. Lanver und R. Kahmann, nicht publiziert). Erst die Kombination aus hydrophober Oberfläche und HPS führt in SG200AM1 zu einer effizienten Appressorienbildung. Während nach Inkubation auf Parafilm ohne Zugabe von HPS nur zwölf Gene in der *sho1/msb2* Doppelmutante im Vergleich zu SG200AM1 differentiell reguliert waren, wurden bei Zugabe von HPS deutliche Unterschiede im Transkriptom von SG200AM1 und SG200AM1 $\Delta$ *sho1* $\Delta$ *msb2* sichtbar. Interessanterweise wurden jedoch Gene, die in der *sho1/msb2* Doppelmutante verglichen mit SG200AM1 eine besonders schwache Expression zeigten (z.B. *um12258*, *um00558*, *um01375* und *um10418*), in beiden Transkriptomanalysen identifiziert. Da Parafilm ohne Zugabe von HPS nur zu etwa 5% Appressorien induziert, sind die Unterschiede im Transkriptom von SG200AM1 $\Delta$ *sho1* $\Delta$ *msb2* und SG200AM1 unter diesen Bedingungen vermutlich auf die wenigen Filamente von SG200AM1 zurückzuführen, die Appressorien bildeten. Die übrigen Filamente, die keine Appressorien bildeten, hatten vermutlich ein mit  $\Delta$ *sho1* $\Delta$ *msb2* Filamenten vergleichbares Transkriptom. Dies deutet darauf hin, dass *sho1* und *msb2* Mutanten in einem Stadium kurz vor der Appressorienbildung arretieren.

Da Sho1 und Msb2 die Appressorienbildung regulieren, war zu erwarten, dass sie an der Expression von Genen beteiligt sind, die für sekretierte CWDEs codieren. Unter den in SG200 $\Delta$ *sho1* $\Delta$ *msb2* im Vergleich mit SG200 60 deregulierten Genen wurden beispielsweise zwei Endoglucanasen (*um02523* und *um04816*), eine Cutinase (*um11211*), eine Pectinesterase (*um12233*), eine Xylanase (*um04422*) und eine Carboxylesterase (*um00154*) identifiziert. Die Deletion von *um00154* führt in *U. maydis* zu einer reduzierten Virulenz (G. Doehlemann, pers. Mitteilung). Es wäre daher interessant zu prüfen, ob diese Mutante Defekte beim Penetrationsvorgang zeigt. In *Colletotrichum higginsianum* konnte gezeigt werden, dass eine putativ sekretierte Endoglucanase für die Penetration der Pflanzenoberfläche und Cellophanmembranen benötigt wird (Huser *et al.*, 2009). Endoglucanasen sind für den Abbau von Cellulose bekannt (Doi und Kosugi, 2004), dem Hauptbestandteil der Maiszellwand (Carpita *et al.*, 2001). Neben den putativen Endoglucanasen *um02523* und *um04816*, die *sho1*- und *msb2*-abhängig exprimiert wurden, wird in *U. maydis* noch die Expression einer dritten Endoglucanase, *egl1* (*um06332*), durch Oberflächenkontakt induziert (P. Berndt, D. Lanver und R. Kahmann, nicht publiziert). Die Einzeldelation dieses Gens zeigte jedoch keine Auswirkung auf die Virulenz von *U. maydis* (Schauwecker *et al.*, 1995). Diese Gene sind möglicherweise redundant, daher

könnte eine Dreifachmutante Aufschluss über die Funktion von sekretierten Endoglucanasen bei der Penetration der Pflanzenoberfläche geben.

Über 70% der *sho1*- und *msb2*-abhängig regulierten Gene codieren für putativ sekretierte Proteine, von denen 75% keine annotierte Funktion haben (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>); sie stellen daher potentielle Effektoren für die biotrophe Entwicklung von *U. maydis* dar. Einige dieser Effektoren wurden bereits auf ihre Funktion während der pathogenen Entwicklung untersucht (Basse *et al.*, 2000, 2002; Kämper *et al.*, 2006; R. Kahmann, pers. Mitteilung). Stp1 und Pit2 sind beispielsweise essentiell für die Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion (K. Schipper und R. Kahmann, pers. Mitteilung, G. Doehlemann, pers. Mitteilung) und die sekretierte Chorismatmutase Cmu1 partizipiert ebenfalls an der biotrophen Entwicklung, indem sie in den Phytohormonhaushalt der Pflanze eingreift (A. Djamei und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Mit Sho1 und Msb2 konnten in dieser Arbeit erstmals putative Rezeptoren identifiziert werden, die in phytopathogenen Pilzen die Expression von sekretierten Effektoren induzieren. Die Oberflächensignale des hier verwendeten *in vitro* Systems waren notwendig und ausreichend für die Induktion. Dies zeigt, dass sich *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche intuitiv auf die biotrophe Lebensweise vorbereitet. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auf der Pflanzenoberfläche weitere Signale dazukommen. Es wurden bereits Transkriptomanalysen von *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche durchgeführt (Vranes, 2006). Dabei wurde eine verstärkte Expression von Genen festgestellt, die für putativ sekretierte Proteine codieren (Vranes, 2006). Es wäre interessant das Transkriptom von *U. maydis* auf artifiziellen Oberflächen mit dem auf der Pflanzenoberfläche zu vergleichen, da dies Hinweise liefern könnte, welchen Einfluss weitere Pflanzensignale auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* haben.

In *M. oryzae* wurden ebenfalls genomweite Transkriptomanalysen auf artifiziellen Oberflächen durchgeführt (Oh *et al.*, 2008). Dabei konnte unter Appressorien-induzierenden Bedingungen eine vierfache Anreicherung von aktivierten Genen festgestellt werden, die für potentiell sekretierte Proteine codieren (Oh *et al.*, 2008). Obwohl derzeit noch unklar ist, ob es sich bei diesen Proteinen um sekretierte Effektoren handelt, die für die hemibiotrophe Entwicklung von *M. oryzae* benötigt werden (Oh *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2002), scheint auch in *M. oryzae* der Oberflächenkontakt ausreichend zu sein, um die biotrophe Entwicklung einzuleiten. Ob nicht auch hier weitere Signale der Pflanzenoberfläche dazukommen, ist derzeit offen.

### 3.3 *sho1/msb2* Doppelmutanten induzieren pflanzlichen Zelltod

In Infektionen mit  $\Delta sho1\Delta msb2$  Stämmen konnte eine starke Abwehrreaktion der Pflanze beobachtet werden, die vermutlich PAMP-induziert ist und nach Penetration von Wildtypenhyphen supprimiert wird (Doehlemann *et al.*, 2008b). Da *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutanten keine Appressorien bilden, sollte auch keine Penetration stattfinden. Dies würde eine Suppression der Pflanzenabwehr verhindern und den Pflanzentod am Infektionsort erklären. Trotz des vollständigen Verlusts der Appressorienbildung konnte mittels qPCR und mikroskopischer Analysen gezeigt werden, dass in sehr seltenen Fällen  $\Delta sho1\Delta msb2$  Hyphen das Pflanzengewebe besiedeln konnten. Dies könnte auf ein saprophytisches Eindringen von *U. maydis* in das Pflanzengewebe zurückzuführen sein, das keine Bildung von Appressorien benötigt. Die aufgrund der Immunantwort abgestorbenen Pflanzenzellen könnten dabei den Eintritt in das Pflanzengewebe erleichtern. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die intrazellulär wachsenden  $\Delta sho1\Delta msb2$  Hyphen in der Lage sind, eine dauerhafte biotrophe Interaktion zu etablieren, da die Expression wichtiger *U. maydis* Effektoren von Sho1 und Msb2 abhängt. Stämme in denen beispielsweise *stp1* deletiert ist, sind nicht in der Lage nach erfolgreicher Penetration die basale Immunantwort der Pflanze zu unterdrücken, was zum Absterben der infizierten Zellen führt (K. Schipper und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Da *stp1* zu den Sho1- und Msb2-abhängig regulierten Genen gehört, ist nicht auszuschließen, dass eine reduzierte Expression von *stp1* in *sho1/msb2* Doppelmutanten zu der starken Pflanzenabwehrreaktion beiträgt. Sho1 und Msb2 haben demnach eine wichtige Funktion bei der Suppression der Pflanzenabwehr.

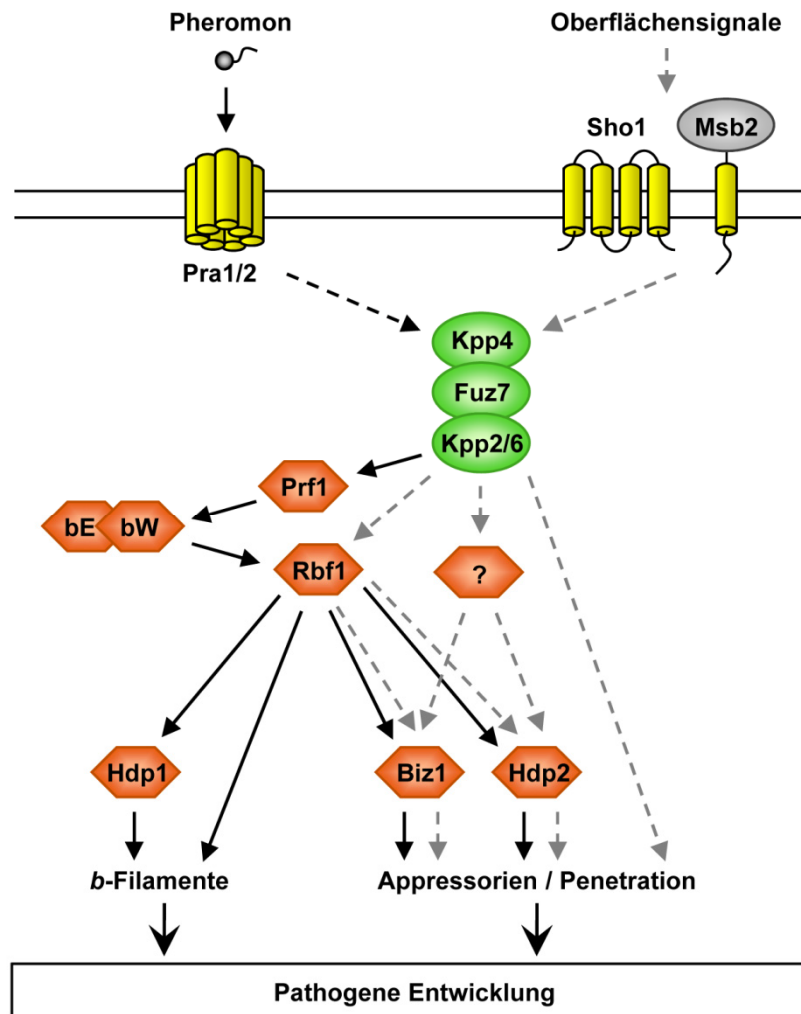
### 3.4 Sho1 und Msb2 agieren oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Kaskade und greifen in die *b*-Kaskade ein

In den letzten Jahren sind Sho1 Orthologe und Msb2-ähnliche Transmembranmucine immer stärker mit der Aktivierung von MAP-Kinase Kaskaden in Verbindung gebracht worden (Seet und Pawson, 2004; Cullen, 2007). Da in *U. maydis* die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 für den Penetrationsvorgang benötigt werden (Müller *et al.*, 2003b; Brachmann *et al.*, 2003), lag die Vermutung nahe, dass Sho1 und Msb2 oberhalb dieser MAP-Kinasen agieren könnten.

Die dual-spezifische Phosphatase Rok1 ist ein negativer Regulator von Kpp2 und Kpp6. *rok1* Deletionsstämme sind hypervirulent, was unter anderem auf verstärkte Appressorienbildung zurückzuführen ist (Di Stasio *et al.*, 2009). Die Deletion von *rok1* im  $\Delta sho1\Delta msb2$  Hintergrund konnte den Virulenzverlust der Doppelmutante vollständig supprimieren. Dies lässt vermuten, dass Sho1 und Msb2 die pathogenitätsrelevante MAP-Kinase Kaskade aktivieren und eine durch die Deletion von *sho1* und *msb2* fehlende Aktivierung durch die Deletion des negativen Regulators von Kpp2 und Kpp6 kompensiert wird. Diese Annahme wird durch ein Experiment unterstützt, das zeigte, dass die Expression eines konstitutiv aktiven Allels von Fuz7 (Fuz7DD), welches Kpp2 und Kpp6 phosphoryliert (Müller *et al.*, 2003b; Di Stasio *et al.*, 2009), den Penetrationsdefekt von  $\Delta sho1\Delta msb2$  Stämmen auf der Pflanzenoberfläche aufheben konnte. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Sho1 und Msb2 in *U. maydis* oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinasen wirken. Bisher ist es leider nicht gelungen MAP-Kinase Phosphorylierung während der Bildung von Appressorien biochemisch zu zeigen (P. Berndt und D. Lanver, nicht publiziert). Um die Funktion der MAP-Kinase Kaskade für die Appressorienbildung weiter aufzuklären und letztlich zu beweisen, dass Sho1 und Msb2 für die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade nötig sind, ist dies jedoch von entscheidender Bedeutung.

Für die Initiation der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* ist eine Phosphorylierung von Prf1 durch Kpp2 notwendig, da phosphoryliertes Prf1 die Expression der *b*-Gene induziert und damit die Bildung septierter, infektiöser Filamente ermöglicht (Kaffarnik *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003b; Zarnack *et al.*, 2008). *sho1* und *msb2* Mutanten waren bei der Bildung dieser Filamente kaum eingeschränkt. Daher war zu erwarten, dass Sho1 und Msb2 kaum Einfluss auf die Expression von *prf1*, *bE*, *bW* und *rbf1*, dem zentralen Regulator unterhalb von *bE/bW* in der Kaskade, haben. Diese Vermutung ließ sich in den Transkriptomanalysen unter Appressorien-induzierenden Bedingungen bestätigen. Es konnte jedoch mit *hdp2* ein transkriptioneller Regulator identifiziert werden, der zum einen Sho1 und Msb2 für seine Expression benötigt und andererseits Rbf1-abhängig exprimiert wird (Heimel *et al.*, 2010). Interessanterweise zeigen *hdp2* Deletionsmutanten einen vollständigen Verlust der Appressorienbildung, während filamentöses Wachstum unbeeinträchtigt ist (M. Scherer und J. Kämper, pers. Mitteilung). Diese Mutanten haben demnach einen mit  $\Delta sho1\Delta msb2$  Stämmen vergleichbaren Phänotyp. Daraus lässt sich ableiten, dass Sho1 und Msb2 in Prozesse der *b*-Kaskade eingreifen, die unterhalb von *b* liegen. Unter der Annahme, dass Sho1 und Msb2 die Kpp4/Fuz7/Kpp2 MAP-Kinase

Kaskade aktivieren, steht dies im Einklang mit der Beobachtung, dass die konstitutive Expression von *b* zwar eine *prf1* Deletion supprimieren kann (Hartmann *et al.*, 1996), nicht aber Deletionen von Komponenten der MAP-Kinase Kaskade (Müller *et al.*, 2003b). Solche Stämme können zwar filamentös wachsen, sind aber dennoch apathogen, was vermutlich auf Defekte in der Appressorienbildung zurückzuführen ist (Müller, 2003).



**Abb. 35: Modellvorstellung für die Einbindung von Sho1 und Msb2 in Signaltransduktionskaskaden.** Nach Pheromonperzeption wird die *b*-Kaskade durch die MAP-Kinase Kaskade aktiviert. Nach der Bildung von *b*-Filamenten werden Oberflächensignale durch Sho1 und Msb2 an die MAP-Kinase Kaskade übertragen, die daraufhin in die *b*-Kaskade eingreift. Dies könnte über Rbf1 oder einen bisher unbekannten Transkriptionsfaktor geschehen. Nähere Informationen finden sich im Text. Pfeile geben physikalische oder genetische Interaktionen an; schwarze Pfeile zeigen die Signaltransduktion ausgehend von Pheromon; graue Pfeile zeigen die Signaltransduktion ausgehend von Oberflächensignalen; gestrichelte Pfeile stehen für Interaktionen, die noch nicht nachgewiesen sind. Membranproteine (gelb), Transkriptionsfaktoren (rot) und Komponenten der MAP-Kinase Kaskade (grün) sind dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die verwandten MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 gemeinsam dargestellt (Kpp2/6).

Eine genauere Betrachtung der Expressionsprofile von Schlüsselkomponenten der *b*-Kaskade zeigte auch, dass die Rbf1-abhängig exprimierten Gene *kpp6* und *biz1* in *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutanten im Vergleich zu SG200AM1 schwächer exprimiert wurden, während die Expression von *hdp1* unverändert war. Damit unterliegen Gene der Kontrolle von Sho1 und Msb2, die eine spezifische Funktion bei der Penetration der Pflanzenoberfläche haben. Insgesamt waren 19 der 60 Sho1- und Msb2-abhängig regulierten Gene zuvor als Rbf1- bzw. Biz1-abhängig identifiziert worden (Heimel *et al.*, 2010; Vranes, 2006), was bestätigt, dass Sho1 und Msb2 Einfluss auf die *b*-Kaskade nehmen. Es wäre demnach interessant zu prüfen, ob eine konstitutive Expression von *hdp2* und *biz1* die Appressorienbildung in  $\Delta sho1 \Delta msb2$  Stämmen wieder herstellen kann.

Die MAP-Kinase Kaskade in *U. maydis* koordiniert die pathogene Entwicklung auf mindestens zwei Ebenen. Die erste Ebene umfasst die Aktivierung der *b*-Kaskade und das damit verbundene filamentöse Wachstum. Dieser Prozess ist abhängig von Pheromonperzeption und Prf1 (Abb. 35; Hartmann *et al.*, 1996; Kaffarnik *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003b). In einem nachfolgenden Schritt reguliert die MAP-Kinase Kaskade den Penetrationsprozess (Müller *et al.*, 2003b; Brachmann *et al.*, 2003). Über diesen Vorgang war bisher nur wenig bekannt. Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen lässt sich ein Modell entwickeln, bei dem nach Perzeption von geeigneten Oberflächensignalen die MAP-Kinase Kaskade durch Sho1 und Msb2 aktiviert wird (Abb. 35). Nach dieser Aktivierung greift die MAP-Kinase Kaskade unterhalb von *b* in die *b*-Kaskade ein und lenkt sie in die Richtung, die zur Ausbildung von Appressorien führt. Dies kann beispielsweise durch Aktivierung eines bisher unbekannten Transkriptionsfaktors erreicht werden (Abb. 35). Es ist jedoch auch möglich, dass Kpp2 die Spezifität von Rbf1 modifiziert und auf diese Weise die Transkription von *hdp2* und *biz1* begünstigt wird (Abb. 35). Für Prf1 wurde bereits gezeigt, dass der Phosphorylierungsstatus entscheidend ist, um zwischen der Expression der *a*- und *b*-Gene zu diskriminieren (Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2008). Rbf1 besitzt fünf vorhergesagte MAP-Kinase Phosphorylierungsstellen (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>). Über entsprechende Substitutionen könnte relativ leicht überprüft werden, ob eine MAP-Kinase-vermittelte Phosphorylierung die Funktion von Rbf1 beeinflusst. Zudem sollte überprüft werden, ob die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade in bE/bW induzierten Filamenten zu einer spezifischen Expression von *hdp2* und *biz1* führt. Dies würde die postulierte Verbindung zwischen MAP-Kinase Kaskade und Sho1 und Msb2 weiter unterstützen.

### 3.5 Gemeinsame und unterschiedliche Funktionen von Sho1 und Msb2 in *U. maydis* und *S. cerevisiae*

In diese Arbeit wurden Komplementationsanalysen durchgeführt, die zeigen, dass *sho1* und *msb2* aus *U. maydis* entsprechende Mutanten in *S. cerevisiae* nicht komplementieren können. In Anbetracht der unterschiedlichen physiologischen Bedeutungen die Sho1 und Msb2 in beiden Organismen haben, war dies jedoch nicht überraschend. Andererseits lassen die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Sho1 und Msb2 aus *U. maydis* und *S. cerevisiae* auch funktionelle Gemeinsamkeiten vermuten.

In *S. cerevisiae* wirken Sho1p und Msb2p sowohl im HOG- als auch im FG-Signalweg (Chen und Thorner, 2007). Für *U. maydis* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Sho1 und Msb2 oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Kaskade stehen. Die entsprechende Signalkaskade in Hefe ist der FG-Signalweg (Zhao *et al.*, 2007). Damit ist die Funktion von Sho1 und Msb2 in *U. maydis* eher mit der Funktion von Sho1p und Msb2p im FG-Signalweg zu vergleichen als mit ihrer Funktion im HOG-Signalweg. In *S. cerevisiae* führen Einzeldelationen von *SHO1* und *MSB2* sowie eine Deletion beider Gene zu vergleichbaren Defekten im pseudohyphalen Wachstum (Cullen *et al.*, 2004). Da eine direkte Interaktion zwischen Sho1p und Msb2p nachgewiesen wurde, wird angenommen, dass nur ein Komplex beider Proteine aktiv ist (Cullen *et al.*, 2004; Tatebayashi *et al.*, 2007; Pitoniak *et al.*, 2009). In *U. maydis* zeigten *sho1* und *msb2* Einzeldelationsmutanten eine reduzierte Virulenz; die Doppelmutante hingegen war apathogen. Auch Transkriptomanalysen konnten zeigen, dass in *sho1* bzw. *msb2* Einzeldelationsmutanten zwar ein nahezu identisches Set an Genen in ihrer Expression beeinträchtigt war, diese Gene im  $\Delta sho1 \Delta msb2$  Hintergrund jedoch nochmals schwächer exprimiert wurden. In *U. maydis* könnten Sho1 und Msb2 daher unabhängig voneinander aktiv sein und erst nach dem Ausschalten beider Komponenten die MAP-Kinase Aktivität nicht mehr ausreichen, um Appressorienbildung auf der Pflanzenoberfläche zu induzieren. Mit Hilfe von Co-Immunpräzipitation, dem Hefe Zwei-Hybrid-System und dem Split-Ubiquitin-System (Stagljar *et al.*, 1998) ist es in dieser Arbeit nicht gelungen, eine Interaktion von Sho1 und Msb2 nachzuweisen (nicht gezeigt). Dies schließt eine Interaktion zwar nicht aus, könnte aber auch als Hinweis für unabhängige Funktionen von Sho1 und Msb2 gesehen werden.

In *U. maydis* Msb2 ist die cytoplasmatische Domäne essentiell für seine Funktion. Wahrscheinlich besitzt sie eine Funktion bei der Signalübertragung. In *S. cerevisiae* interagiert der C-Terminus von Msb2p mit Cdc42, was vermutlich zu einer Sho1-

abhängigen Aktivierung des FG-Signalwegs führt (Cullen *et al.*, 2004). In *U. maydis* sind kleine GTPasen interessante Kandidaten für die Signalweiterleitung von Msb2, da beispielsweise Mutanten von *cdc42*, *rac1* und *ras2* apathogen sind und für Ras1, Ras2 und Rac1 bereits eine Verbindung zur MAP-Kinase Kaskade gezeigt wurde (Mahlert, 2006; Mahlert *et al.*, 2006; Lee und Kronstad, 2002; Müller *et al.*, 2003a; A. Bauer und M. Bölker, pers. Mitteilung). Es konnte jedoch bisher weder eine Interaktion von Msb2 mit kleinen GTPasen der Rho/Rac Familie noch mit solchen der Ras Familie nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Da die cytoplasmatischen Domänen von *U. maydis* Msb2 und *S. cerevisiae* Msb2p nur sehr schwach konserviert sind, sind auch andere, eventuell Sho1-unabhängige Wege der Signalweiterleitung möglich. Für das humane Transmembranmucin Muc1 wurde gezeigt, dass der cytoplasmatische C-Terminus mit dem Adapterprotein Grb2 interagiert und erst auf diese Weise der Kontakt zur kleinen GTPase RAS und dem GEF (*guanosine nucleotide exchange factor*) SOS hergestellt wird (Pandey *et al.*, 1995). Dieser Komplex kann dann die MAP-Kinase Kaskade aktivieren (Schroeder *et al.*, 2001; Meerzaman *et al.*, 2001). Auch in *U. maydis* könnten Adapterproteine existieren, die Msb2 mit kleinen GTPasen in Kontakt bringen.

In *S. cerevisiae* hat Sho1p Aufgaben eines Gerüstproteins und wird vermutlich über Hkr1p im HOG-Signalweg und über Msb2p im FG-Signalweg aktiviert (Raitt *et al.*, 2000; Reiser *et al.*, 2000; Zarrinpar *et al.*, 2004; Cullen *et al.*, 2004; Tatebayashi *et al.*, 2007; Pitoniak *et al.*, 2009). Eine Funktion von Sho1p als eigenständiger Sensor für extrazelluläre Signale ist aufgrund der Domänenstruktur des Proteins eher unwahrscheinlich (Raitt *et al.*, 2000). Wie im HOG-Signalweg wird auch im FG-Signalweg die SH3-Domäne von Sho1p für seine Funktion benötigt. Welche Komponenten von ihr für die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade gebunden werden, ist jedoch nicht bekannt (P. Cullen, pers. Mitteilung). Da in *U. maydis* die SH3-Domäne von Sho1 ebenfalls essentiell für die Funktion des Proteins ist (Lanver *et al.*, 2010), kann, ähnlich wie in Hefe, eine Funktion von Sho1 bei der Rekrutierung von Komponenten der MAP-Kinase Kaskade an die Cytoplasmamembran vermutet werden. Sollte dies der Fall sein, ist dafür vermutlich eine Aktivierung von Sho1 nötig. Diese Aufgabe könnte Msb2 übernehmen. Da *U. maydis* jedoch keine Msb2 Paraloge besitzt (Krantz *et al.*, 2006; A. Fernandez-Alvarez, D. Lanver und J. I. Ibeas, nicht publiziert), müssten andere Proteine in der Lage sein, Sho1 in Abwesenheit von Msb2 zu aktivieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten an, dass die Mechanismen der Signalweiterleitung von Sho1 und Msb2 in *U. maydis* sich deutlich von denen in *S. cerevisiae* unterscheiden.



Die Aufklärung dieser Mechanismen erfordert jedoch weitere Experimente. Ein wichtiger Ansatzpunkt wäre dabei die Identifizierung von Interaktionspartnern von Sho1 und Msb2.

### 3.5.1 Sho1 interagiert mit einer negativ regulatorischen Domäne von Kpp6

Vorrangegangene Studien konnten Sho1 als Interaktionspartner von Kpp6 identifizieren (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a). Kpp6 ist eine ungewöhnliche MAP-Kinase, die sich durch eine etwa 170 Aminosäuren große N-terminale Domäne auszeichnet, die in Kpp2 fehlt (Brachmann *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Sho1 und Kpp6 über die SH3-Domäne von Sho1 und einer Typ I PRD (KPLPPSP) im N-Terminus von Kpp6 vermittelt wird. In Pathogenitätstests konnte ein Kpp6-Allel, das aufgrund von Mutationen der PRD nicht mehr in der Lage ist, mit Sho1 zu interagieren, den Pathogenitätsdefekt von *kpp6* Deletionsmutanten besser komplementieren als Wildtyp Kpp6, allerdings nur in Anwesenheit von Sho1. Dies zeigt, dass die N-terminale Domäne von Kpp6 negativ regulatorische Eigenschaften besitzt, die durch eine Interaktion mit Sho1 vermittelt werden. Zudem konnte durch ein N-terminal verkürztes Kpp6-Allel gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne von Kpp6 weitere, Sho1-unabhängige negativ regulatorische Funktionen besitzt.

Die Beobachtung, dass die Interaktion von Kpp6 und Sho1 die Virulenz von *U. maydis* negativ beeinflusst, lässt vermuten, dass diese Interaktion Bestandteil einer negativen Rückkopplungsschleife während der Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade ist. Im HOG-Signalweg in *S. cerevisiae* wird Sho1p durch aktiviertes Hog1p phosphoryliert, was zu einer Inaktivierung von Sho1p führt und eine sensitive Anpassung an die osmotischen Bedingungen gewährleistet (Hao *et al.*, 2007). Die cytoplasmatische Domäne von Sho1 besitzt drei vorhergesagte MAP-Kinase Phosphorylierungsstellen (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>). Die gleichzeitige Mutation aller drei putativen Phosphorylierungsstellen in Sho1 hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Virulenz von *U. maydis* (nicht gezeigt). Dies macht eine Phosphorylierungs-basierte Rückkopplungsschleife zwischen Sho1 und Kpp6 unwahrscheinlich. Da die SH3-Domäne von Sho1 essentiell für seine Funktion ist, besteht jedoch die Möglichkeit, dass diese Domäne während der Appressorienbildung durch Bindung von Kpp6 blockiert wird. In *S. cerevisiae* wird bei osmotischem Stress die MAPK-Kinase Pbs2p durch eine Typ I PRD (KPLPPLP) an die SH3-Domäne von Sho1 gebunden (Maeda *et al.*, 1995; Raitt *et al.*, 2000; Reiser *et al.*, 2000). Das Pheromon-induzierte Protein Fus1p besitzt ebenfalls eine Typ I PRD

(KPLPLTP; Tong *et al.*, 2002). Während der Paarungsreaktion kommt es durch Bindung von Fus1p an die SH3-Domäne von Sho1 zu einer kompetitiven Hemmung der Interaktion mit Pbs2p (Nelson *et al.*, 2004). Es wäre also vorstellbar, dass Kpp6 in *U. maydis* mit bisher nicht identifizierten Interaktionspartnern von Sho1 um Bindung an die SH3-Domäne konkurriert. Es wäre weiterhin möglich, dass eine Aktivierung von Kpp6 die Interaktion mit Sho1 beeinflusst. Dies könnte mittels Co-Immunpräzipitation nach *fuz7DD* Induktion überprüft werden. Sollte sich bestätigen, dass die Aktivierung von Kpp6 zu einer Verstärkung der Interaktion führt, kann eine negative Rückkopplungsschleife zwischen Kpp6 und Sho1 existieren, die auf einer Blockierung der SH3-Domäne von Sho1 beruht.

Eine zusätzliche Erklärung für die gesteigerte Virulenz von Stämmen, die PRD mutiertes *kpp6* bzw. N-terminal verkürztes *kpp6* exprimierten, könnten ihre Kpp6 Proteinmengen sein. Die Mutation der PRD in Kpp6 sowie die Deletion von *sho1* führten zu einer Erhöhung der Kpp6 Proteinmengen. Dies könnte bedeuten, dass die Interaktion mit Sho1 zu einer Destabilisierung von Kpp6 führt. Vorrangegangene Studien zeigten, dass *kpp6* auf transkriptioneller Ebene komplex reguliert wird (Brachmann, 2003). Es kann spekuliert werden, dass Kpp6 auch posttranslationell einer komplexen Regulation unterliegt, an der Sho1 partizipiert.

Es bleibt festzuhalten, dass der N-Terminus von Kpp6 negativ regulatorische Eigenschaften besitzt. Da biotrophe Pilze auf die lebende Wirtspflanze angewiesen sind, benötigen sie Mechanismen, ihre Pathogenität zu kontrollieren (Kämper *et al.*, 2006). Der N-Terminus von Kpp6 könnte eine Feinregulation des Penetrationsprozesses ermöglichen und unter natürlichen Bedingungen eine optimale Anpassung der Virulenz von *U. maydis* an seine Wirtspflanze gewährleisten.

### **3.5.2 Posttranslationelle Modifikationen von Msb2 beeinflussen seine Funktion**

Transmembranmucine wie Msb2 zeichnen sich durch eine Serin/Threonin-reiche, hoch glycosylierte extrazelluläre Domäne und einen cytoplasmatischen C-Terminus aus (Singh und Hollingsworth, 2006). Die molekulare Masse von Mucinen besteht zu 50 - 90% aus Oligosaccharidketten (Hatstrup *et al.*, 2008). Dies erklärt, warum für Msb2 aus *U. maydis* eine wesentlich größere Masse als vorhergesagt detektiert wurde. Sowohl für Msb2p aus *S. cerevisiae* wie auch für Msb2 aus *U. maydis* konnte Glycosylierung nachgewiesen werden (Cullen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009; A. Fernandez-Alvarez, D. Lanver und J. Ibeas,

nicht publiziert). In *S. cerevisiae* führen Mutationen in Komponenten für die Proteinglycosylierung zu einer Sho1p- und Msb2p-abhängigen Aktivierung der MAP-Kinase Kss1p (Cullen *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2004). Zudem konnte mit Pmt4p eine Mannosyltransferase identifiziert werden, die Msb2p vermutlich direkt mannosyliert (Yang *et al.*, 2009); unter Bedingungen, die in Wildtypzellen nicht induktiv für den FG-Signalweg sind, zeigen *PMT4* Deletionsmutanten in Abhängigkeit von Msb2p erhöhte MAP-Kinase Aktivität sowie pseudohyphales Wachstum (Yang *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in *S. cerevisiae* die Deletion der glycosylierten STR-Domäne zu einer konstitutiv aktiven Variante von Msb2 führt. Solche Stämme zeigen konstitutive Pseudohyphenbildung und erhöhte MAP-Kinase Aktivität (Cullen *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* wird der STR Domäne von Msb2p daher eine negativ regulatorische Funktion zugesprochen (Cullen *et al.*, 2004). In *U. maydis* führt die Hyperaktivierung der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 zu einer verstärkten Appressorienbildung und erhöhter Virulenz (Di Satsio *et al.*, 2009; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009b). Es ist also davon auszugehen, dass die Expression eines konstitutiv aktiven Msb2 Proteins die Virulenz von *U. maydis* steigern würde. Im Gegensatz zu Hefe führte in *U. maydis* die Deletion der STR-Domäne von Msb2 jedoch zu einem nicht funktionellen Protein, was sich in einer stark reduzierten Virulenz äußerte. Auch in *U. maydis* wird Msb2 durch Pmt4 mannosyliert (A. Fernandez-Alvarez, D. Lanver und J. Ibeas, nicht publiziert). Interessanterweise sind *pmt4* Deletionsmutanten in *U. maydis* in ihrer Virulenz drastisch reduziert und zeigen spezifische Defekte bei Appressorienbildung (Fernandez-Alvarez *et al.*, 2009). Damit weisen *pmt4* Mutanten ähnliche Pathogenitätsdefekte wie *msb2* Mutanten auf. Ob die beobachteten Virulenzdefekte von *pmt4* Mutanten auf eine verringerte MAP-Kinase Aktivität zurückzuführen sind, muss noch untersucht werden. Möglicherweise ist in *U. maydis* eine Pmt4-vermittelte Glycosylierung von Msb2 notwendig für die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade.

Ein charakteristisches Merkmal von Transmembranmucinen ist ihre posttranslationelle Prozessierung, die zu einer Spaltung des Volllängenproteins in eine hoch glycosylierte extrazelluläre Domäne und eine membranverankerte C-terminale Domäne führt (Singh und Hollingsworth, 2006; Cullen, 2007). Durch das hier verwendete Msb2-HA-GFP Protein, welches die separate Detektion des N-Terminus (HA) und des C-Terminus (GFP) erlaubte, konnte auch für Msb2 in *U. maydis* eine solche Prozessierung nachgewiesen werden. Da mit Hilfe von Antikörpern gegen GFP kaum Msb2-HA-GFP Volllängenprotein nachgewiesen wurde, liegt Msb2 in *U. maydis* wahrscheinlich hauptsächlich in seiner

prozessierten Form vor. Zudem konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus nur transient in der Cytoplasmamembran lokalisiert und über Actin-abhängige Endocytose internalisiert wird. In adhäsiven Filamenten, die von einer ECM umgeben sind, konnte durch Immunfluoreszenz der N-Terminus von Msb2 in der Zellperipherie lokalisiert werden. Da der N-Terminus in axenischer Kultur im Kulturüberstand und im Zellpellet nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass die extrazelluläre Domäne von Msb2 sowohl Bestandteil der Zellwand ist als auch in die ECM abgegeben wird. Während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* auf einer hydrophoben Oberfläche könnte die sekretierte Form der extrazellulären Domäne demnach ein struktureller Bestandteil der ECM sein. Aus *M. grisea* ist bekannt, dass  $\alpha$ -Mannosidasen,  $\alpha$ -Glucosidasen und Proteasen, nicht aber Lipasen und Chitinasen zu einer Zerstörung der ECM, und damit zu verringerter Adhäsion und Appressorienbildung führen (Xiao *et al.*, 1994). Demnach vermitteln sekretierte Glycoproteine die Adhäsion zwischen Pilzhyphe und Oberfläche. Vorläufige Ergebnisse weisen zwar nicht auf eine Funktion von Msb2 bei der Adhäsion an Oberflächen hin (K. Hofmann, pers. Mitteilung; nicht gezeigt), es ist jedoch anzunehmen, dass viele Glycoproteine an der Adhäsion beteiligt sind und das Fehlen eines dieser Proteine durch andere Glycoproteine kompensiert werden kann.

Es wird allgemein angenommen, dass die Prozessierung von Transmembranmucinen ein notwendiges Ereignis für ihre Funktion ist (Wreschner *et al.*, 2002; Cullen, 2007). Die Prozessierung erfolgt entweder autoproteolytisch oder mit Hilfe von Proteasen (Levitin *et al.*, 2005; Macao *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2006; Vadaie *et al.*, 2008). In *S. cerevisiae* wird Msb2p über Yps1p, eine Aspartylprotease der Yapsin-Familie, gespalten (Vadaie *et al.*, 2008). Yps1p ist essentiell für die Msb2p-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade; außerdem erhöht eine Überexpression von *YPS1* die Aktivität der MAP-Kinase (Vadaie *et al.*, 2008). Interessanterweise wird die *YPS1* Expression durch Nährstoffmangel induziert, was sich direkt auf die Prozessierung von Msb2p und die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade auswirken könnte (Vadaie *et al.*, 2008). Ob in *U. maydis* Aspartylproteasen für die Prozessierung von Msb2 verantwortlich sind, ist derzeit nicht bekannt. Bemerkenswerterweise konnte in den hier durchgeführten Transkriptomanalysen ein Sho1- und Msb2-abhängig exprimiertes Gen identifiziert werden, *um05097*, das für eine sekretierte Aspartylprotease codiert. Es wäre interessant zu testen, ob diese Aspartylprotease an der Prozessierung von Msb2 beteiligt ist.

Deletionsanalysen ergaben, dass sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Domäne von Msb2 für die Funktion des Proteins in *U. maydis* benötigt werden. Auch die

gleichzeitige Expression der verkürzten Proteine konnte das Volllängen Msb2 Protein nicht ersetzen. Die Beobachtung, dass  $\Delta shol\Delta msb2$  Mutanten, die N-terminal bzw. C-terminal verkürzte *msb2*-Allele exprimierten, in einzelnen Fällen in der Lage waren schwache Symptome in infizierten Pflanzen zu induzieren, deutet an, dass der N-Terminus und der C-Terminus auch separat voneinander noch eine abgeschwächte Aktivität besitzen. Da die kombinierte Expression dieser Allele jedoch keine Steigerung der Virulenz bewirkte, besteht auch die Möglichkeit, dass die beobachtete Restaktivität auf den überlappenden Bereich, der in beiden Proteinen vorliegt, zurückzuführen ist. Für das N-terminal verkürzte Msb2 Protein konnten in Western-Analysen große Mengen an nicht prozessiertem Protein detektiert werden. Die Prozessierung könnte demnach durch die N-terminale Domäne positiv beeinflusst sein. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass der Funktionsverlust des verkürzten Msb2 Proteins auf eine verminderte Prozessierung zurückzuführen ist, da prozessiertes Protein vorhanden war und die Expression der N-terminal bzw. C-terminal verkürzten Msb2 Proteine keinen dominant negativen Effekt auf die Virulenz von SG200 hatte. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die intra- und extrazelluläre Domäne von Msb2 nur gemeinsam ein aktives Protein bilden. Für das humane Transmembranmucin Muc1 konnte gezeigt werden, dass nach Spaltung des Volllängenproteins die entstandenen Fragmente reassemblieren (Ligtenberg *et al.*, 1992). Diese Möglichkeit besteht auch in *U. maydis*.

### 3.5.3 Ist Msb2 ein Sensor für Oberflächensignale?

Für Transmembranmucine wurde postuliert, dass sie Sensoren für eine Vielzahl von extrazellulären Signalen sind. Diese Signale werden über die extrazelluläre Domäne wahrgenommen und über den cytoplasmatischen C-Terminus an intrazelluläre Signalkaskaden übertragen (Singh und Hollingsworth, 2006). Für das humane Muc1 wurde beispielsweise gezeigt, dass bakterielles Flaggelin oder das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM Liganden der extrazellulären Domäne sind, die zur Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade führen (Lillehoy *et al.*, 2004; Rahn *et al.*, 2004). Zudem wird diskutiert, dass chemische Veränderungen der Umgebung, wie beispielsweise pH und Ionen-Komposition von Transmembranmucinen wahrgenommen werden (Singh und Hollingsworth, 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Msb2 in *U. maydis* an der Perzeption von Oberflächen beteiligt ist. In *S. cerevisiae* ist bisher nicht bekannt, welche

Signale von Msb2p wahrgenommen werden (P. Cullen, pers. Mitteilung). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Msb2p auch in Hefe an der Erkennung von Oberflächen beteiligt ist, da pseudohyphales Wachstum nur auf festen Oberflächen, wie beispielsweise Agarmedium, beobachtet wird (P. Cullen, pers. Mitteilung). Wie also könnten Oberflächensignale von Msb2 wahrgenommen werden? Stark O-glycosylierte Proteine besitzen aufgrund von sterischen Interaktionen zwischen den Kohlenhydraten und den Peptiden wahrscheinlich eine starre Struktur (Jentoft, 1990). Die durchschnittliche Distanz einer Peptidbindung beträgt 0,36 nm. Daraus resultiert eine Länge von 322 nm für die extrazelluläre Domäne von *U. maydis* Msb2. Da in Hefen eine Zellwanddicke von etwa 100 nm gemessen wurde (Klis *et al.*, 2002), müsste die Länge von Msb2 ausreichen, um die pilzliche Zellwand vollständig zu durchspannen. Ob ein direkter Kontakt zur Oberfläche erreicht wird, ist allerdings fraglich. Wahrscheinlicher wäre eine indirekte Wahrnehmung von Oberflächensignalen.

Mikroorganismen sekretieren eine weite Bandbreite sowohl hydrophiler als auch hydrophober Substanzen und Proteine (Gebblink *et al.*, 2005; Flemming und Wingender, 2010). Diese Moleküle haben entscheidenden Einfluss auf die adhäsiven Eigenschaften von Mikroorganismen an Oberflächen, was mit dynamischen Veränderungen der ECM einhergeht (Gebblink *et al.*, 2005; Flemming und Wingender, 2010). Msb2 könnte während des adhäsiven Wachstums von *U. maydis* auf Oberflächen Veränderungen in der Komposition der ECM wahrnehmen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Perturbationen der Zellwand von Msb2 registriert werden. Die starke Adhäsion von pilzlichen Filamenten an hydrophobe Oberflächen führt zu einer Verformung der Filamente (Epstein *et al.*, 1987). Für das glycosylierte Typ I Transmembranprotein Wsc1p, welches ein Aktivator des CWI (*cell wall integrity*)-Signalwegs in *S. cerevisiae* ist (Verna *et al.*, 1997; Lodder *et al.*, 1999), konnten Dupres *et al.* (2009) zeigen, dass sich bei osmotischem und Temperatur-induziertem Stress seine mechanischen Eigenschaften *in vivo* verändern. Dies könnte durch Veränderungen in der Elastizität der Zellwand induziert werden (Dupres *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Msb2 Orthologe in vielen Pilzen in die Antwort auf osmotischen Stress und Zellwandstress involviert sind (O'Rourke und Herskowitz, 2002; Tatebayashi *et al.*, 2007; Norice *et al.*, 2007; Roman *et al.*, 2009; Perez-Nadales und Di Pietro, 2011). Es wäre also möglich, dass die Wahrnehmung von Zellwandstress und die Oberflächenperzeption ähnliche molekulare Mechanismen erfordern und dies über Transmembranmucine wie Msb2 erreicht wird. Msb2 könnte also als Mechanosensor fungieren.

### 3.6 Sho1 und Msb2 sind konservierte Pathogenitätsfaktoren in phytopathogenen Pilzen

Die pathogene Entwicklung von vielen Pilzen wird durch konservierte MAP-Kinase Kaskaden gesteuert. In phytopathogenen Pilzen haben vor allem Kss1-orthologe MAP-Kinasen eine entscheidende Funktion. Sie regulieren meist Appressorienbildung sowie invasives Wachstum in der Wirtspflanze (Zhao *et al.*, 2007). In *S. cerevisiae* reguliert Kss1p pseudohyphales Wachstum und Sho1p und Msb2p stehen an der Spitze des Signalwegs. Entgegen der Vorstellung, dass phytopathogene Pilze neue Rezeptoren entwickelt haben um Signale der Wirtspflanzen wahrzunehmen (Zhao *et al.*, 2007), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in *U. maydis* Orthologe von Sho1 und Msb2 oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Kaskade agieren und spezifisch den Penetrationsprozess steuern.

In Pilzen sind Sho1 und Msb2 konservierte Proteine (Krantz *et al.*, 2006). Dies wirft die Frage auf, ob Sho1 und Msb2 konservierte Pathogenitätsfaktoren sind. Kürzlich wurden Sho1- und Msb2-orthologe Proteine in dem Reis Pathogen *M. oryzae* charakterisiert (Liu *et al.*, 2011). MoMsb2 ist an der Perzeption von Oberflächen beteiligt, während MoSho1 für die Erkennung von Wachs-Komponenten wichtig ist. Beide Signale induzieren Appressorienbildung in *M. oryzae* (Lee und Dean, 1993; Dixon *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2011). Die Doppeldeletion von *MoSHO1* und *MoMSB2* führt zu einer drastisch reduzierten Appressorienbildung und Virulenz (Liu *et al.*, 2011). Außerdem agieren MoSho1 und MoMsb2 oberhalb der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Pmk1 (Liu *et al.*, 2011). In *M. oryzae* haben MoSho1 und MoMsb2 demnach eine ähnlich wichtige Bedeutung für die pathogene Entwicklung, wie Sho1 und Msb2 in *U. maydis*. Auch in MoMsb2 ist, wie in Msb2 aus *U. maydis* und im Gegensatz zu Msb2p aus *S. cerevisiae*, die STR-Domäne essentiell für die Funktion des Proteins (Liu *et al.*, 2011). Dies stimmt mit der spezifischen Funktion überein, die sowohl MoMsb2 in *M. oryzae* wie auch Msb2 in *U. maydis* bei der Ausbildung von Appressorien haben.

In *F. oxysporum* wurden Sho1- und Msb2-orthologe Proteine identifiziert, die für die Aktivierung der pathogenitätsrelevanten MAP-Kinase Fmk1 benötigt werden (Perez-Nadales und Di Pietro, 2011; E. Perez-Nadales und A. Di Pietro, pers. Mitteilung). *F. oxysporum* bildet keine Appressorien aus, sondern dringt über Wurzeln, die keine Cuticula besitzen, in seine Wirtspflanzen ein. Einzeldelentionsmutanten von *sho1* und *msb2* sind in ihrer Virulenz reduziert, während *sho1/msb2* Doppeldeletionsmutanten nahezu apathogen

sind und somit die gleichen Virulenzdefekte zeigen wie *fmk1* Deletionsmutanten (Perez-Nadales und Di Pietro, 2011; E. Perez-Nadales und A. Di Pietro, pers. Mitteilung). Da diese Mutanten nicht in der Lage sind, artifizielle Oberflächen wie Cellophan zu penetrieren, wird angenommen, dass eine mangelnde Oberflächenperzeption ursächlich für die beobachteten Virulenzdefekte ist (Perez-Nadales und Di Pietro, 2011; E. Perez-Nadales und A. Di Pietro, pers. Mitteilung). In *F. oxysporum* erfüllen Sho1 und Msb2 demnach ebenfalls Funktionen, die mit denen in *U. maydis* vergleichbar sind.

In *B. cinerea*, dem Erreger der Grauschimmelfäule, wurde ein *msb2* Ortholog identifiziert, dessen Deletion ebenfalls zu reduzierter Appressorienbildung führt und sich in einer stark verzögerten Virulenz äußert (M. Hahn, pers. Mitteilung). Auch diese Mutanten haben vermutlich Defekte bei der Oberflächenperzeption (M. Hahn, pers. Mitteilung).

Sho1 und Msb2 sind demnach konservierte Pathogenitätsfaktoren in phytopathogenen Pilzen. Zudem wird die Vermutung unterstützt, dass Msb2 für die Perzeption von Oberflächen zuständig ist, da auch in *M. oryzae*, *F. oxysporum* und *B. cinerea* die Deletion von *msb2* zu spezifischen Defekten bei der Differenzierung auf Oberflächen führt. Bemerkenswerterweise haben Sho1- und Msb2-orthologe Proteine in den opportunistisch humanpathogenen Pilzen *Candida albicans* und *A. fumigatus* zwar Einfluss auf Stressresistenz, jedoch kaum Einfluss auf die Virulenz (Ma *et al.*, 2008; Roman *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu phytopathogenen Pilzen werden diese Pilze im Laufe der Infektion jedoch nicht mit festen und hydrophoben Oberflächen konfrontiert. Sho1 und Msb2 scheinen demnach ein entscheidender Schlüssel für das Durchbrechen dieser Barrieren zu sein.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von der Qualität *p. a.* und wurden vorwiegend von den Firmen Difco (Augsburg), Fluka (Buchs/Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Asubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, soweit notwendig, vor Verwendung für 5 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck, Darmstadt) sterilfiltriert.

#### 4.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt), KOD Extreme Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt), Taq DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) und Klenow-Fragment (NEB, Frankfurt) verwendet. Die Ligation von DNA-Molekülen wurde mit T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim) durchgeführt. Für den enzymatischen Abbau von RNA wurde RNase A (Serva, Heidelberg) verwendet. Enzymatischer Abbau von Zellwänden erfolgte mit Lysozym (Roche, Mannheim) und Novozym 234 (Novo Nordisc; Kopenhagen, Dänemark). Antikörper wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roche (Mannheim), Cell Signaling Technology (Danver/USA), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), Calbiochem/Merck (Darmstadt) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Eine detaillierte Auflistung der Antikörper findet sich in Kapitel 4.6.3.2 (Tab. 7).

#### 4.1.4 Verwendete Kits

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) verwendet. Für die Aufreinigung von Plasmiden wurde das QIAprep Mini Plasmid Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) wurde zur Klonierung von PCR-Produkten benutzt. Spezielle Kits sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

### 4.2 Zellkultivierung

#### 4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* Stämme wurden in dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Als Antibiotikum wurde entweder Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

dYT-Flüssigmedium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	1,6% (w/v) Trypton-Pepton 1,0% (w/v) Yeast Extract 0,5% (w/v) NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
YT- Festmedium	0,8% (w/v) Trypton-Pepton 0,5% (w/v) Yeast Extract 0,5% (w/v) NaCl 1,3% (w/v) Bactoagar in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

#### 4.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde bei 28°C und 200 Upm aerob angezogen. Als Vollmedium diente YEPD-Medium. Für Stämme mit Auxotrophien wurde SD-Medium mit den entsprechenden Aminosäure-Supplementen eingesetzt. Für die Hefe Zwei-Hybrid-Analysen und Komplementationsanalysen wurden die Transformanten in entsprechendem SD-Selektionsmedium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden serielle Verdünnungen (1:10) hergestellt, je 6 µl dieser Suspensionen auf entsprechendes SD-Festmedium getropft und

die Platten bei 28°C inkubiert. Für Dauerkulturen wurde 25% (v/v) Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

YEPD-Medium	2% (w/v) Pepton (Difco) 1% (w/v) Hefeextrakt in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> [Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar]
SD-Basismedium	0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 2% Glucose (nach dem Autoklavieren) in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> [Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar]
Aminosäure-Supplemente	0,002% (w/v) L-Adenin Hemisulfat 0,002% (w/v) L-Arginin HCl 0,002% (w/v) L-Histidin HCl 0,003% (w/v) L-Isoleucin 0,01% (w/v) L-Leucin 0,003% (w/v) L-Lysin HCl 0,002% (w/v) L-Methionin 0,005% (w/v) L-Phenylalanin 0,02% (w/v) Threonin 0,002% (w/v) L-Tryptophan 0,003% (w/v) L-Tyrosin 0,002% (w/v) L-Uracil 0,015% (w/v) L-Valin

#### 4.2.3 Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis* Kulturen wurden standardmäßig in YEPSL Flüssigmedium bei 200 Upm inkubiert. Für Festmedien wurden Potato-Dextrose (PD)-Agarplatten verwendet, die ggf. mit den Antibiotika Hygromycin (200 µ/ml), Nourseothricin (75 µg/ml) oder Carboxin (5 µg/ml) versetzt wurden. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50% NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur.

YEPSL (modifiziert nach Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	1% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Pepton 1% (w/v) Saccharose in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Potato-Dextrose-Agar (PD)	3,9% (w/v) Potato Dextrose Agar in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

PD-Aktivkohle wie PD, jedoch zusätzlich  
1,0% (w/v) Aktivkohle

NSY-Glycerin 0,8% (w/v) Nutrient Broth  
0,1% (w/v) Hefeextrakt  
0,5% (w/v) Saccharose  
69,6% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Für Stressmedien wurde Complete Medium (CM) verwendet. Nach dem Autoklavieren wurde Kongorot (70 µg/ml), Calcofluor white (45 µg/ml) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 mM) zugegeben. Sorbitol (2 M) und NaCl (1 M) wurden vor dem Autoklavieren beigemischt. Um auf Sensitivität gegen die jeweiligen Stressoren zu testen, wurden Stämme in YEPSL zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden serielle Verdünnungen (1:10) hergestellt und je 6 µl dieser Suspensionen auf entsprechendes Festmedium getropft. Um auf filamentöses Wachstum zu testen, wurden Zellsuspensionen auf PD-Aktivkohle-Platten getropft bzw. Zellen auf SLAD (*synthetic low ammonium dextrose*)-Medium vereinzelt.

CM Vollmedium (Holliday, 1974) 0,15% (w/v) NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
0,25% (w/v) Casaminosäuren  
0,05% (w/v) Heringsperma-DNA  
0,1% (w/v) Hefeextrakt  
1% (v/v) Vitaminlösung  
6,25% (v/v) Salzlösung  
2% Glucose (nach dem Autoklavieren)  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>; pH 7,0 (mit NaOH)  
[Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar]

SLAD (modifiziert nach Gimeno *et al.*, 1992) 50 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
2% (w/v) Bactoagar  
1% Glucose (nach dem Autoklavieren)  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Vitaminlösung (Holliday, 1974) 0,1‰ (w/v) Thiamin  
0,05‰ (w/v) Riboflavin  
0,05‰ (w/v) Pyridoxin  
0,2‰ (w/v) Kalziumpantothenat  
0,05‰ (w/v) para-Aminobenzoesäure  
0,2‰ (w/v) Nikotinsäure  
0,2‰ (w/v) Cholinchlorid  
1,0‰ (w/v) myo-Inositol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>; sterilfiltriert

Salzlösung (Holliday, 1974)	1,6% (w/v) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,8% (w/v) $\text{KCl}$ 0,4% (w/v) $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (w/v) $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,8% (v/v) Spurenelementlösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$
Spurenelementlösung	0,06‰ (w/v) $\text{H}_3\text{BO}_3$ 0,14‰ (w/v) $\text{MnCl} \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4‰ (w/v) $\text{ZnCl}_2$ 0,4‰ (w/v) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1‰ (w/v) $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,03‰ (w/v) $\text{CuSO}_4$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$

#### 4.2.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem NovaspecII Gerät (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde die  $\text{OD}_{600}$  des entsprechenden Kulturmediums verwendet. Bei *U. maydis* und *S. cerevisiae* entspricht eine  $\text{OD}_{600}$  von 1,0 etwa einer Zellzahl von  $1 - 5 \times 10^7$  Zellen.

### 4.3 Stämme, Oligonukleotide und Plasmide

#### 4.3.1 *E.coli* Stämme

Für alle Durchführungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt; ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ ,  $\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ ,  $\Delta\text{lacX74}$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta(\text{ara-leu})7697$ , *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

#### 4.3.2 *S. cerevisiae* Stämme

Für die Hefe Zwei-Hybrid-Analysen wurde der Stamm AH109 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich) verwendet. Die *SHO1* und *MSB2* Deletionsstämme (PC1531 und PC948) sowie deren Ausgangsstamm (PC538) wurden freundlicherweise von P. Cullen zur Verfügung gestellt. In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme aufgelistet.

**Tab. 2: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
PC538	<i>MATa ste4 FUS1-lacZ FUS1-HIS3 ura3-52</i>	Cullen <i>et al.</i> , 2004
PC948	<i>MATa ste4 FUS1-lacZ FUS1-HIS3 ura3-52 msb2::KanMX6</i>	Cullen <i>et al.</i> , 2004
PC1531	<i>MATa ste4 FUS1-lacZ FUS1-HIS3 ura3-52 sho1::Hyg</i>	Vadaie <i>et al.</i> , 2008
AH109	<i>MATa trp1-901 leu2-3 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ</i> <i>LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3 GAL2<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-ADE2</i> <i>URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	A. Holtz, nicht publiziert

### 4.3.3 *U. maydis* Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. maydis* Stämme (Tab. 3) sowie die in dieser Arbeit hergestellten Stämme (Tab. 4) aufgeführt. Bei der Herstellung von Deletionsmutanten wurde das jeweilige Gen nach Kämper (2004) und Brachmann *et al.* (2004) durch eine Resistenzkassette ersetzt. Für die Integration von Genen in den *ip*-Locus (*sdh2*) wurden Plasmide verwendet, die ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ip<sup>R</sup>*) tragen (Broomfield und Hargreaves, 1992). Diese Plasmide wurden über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven, *ip*-Allel (*ip<sup>S</sup>*) in das Genom von *U. maydis* eingebracht. Alle Stämme wurden durch Southern-Analysen verifiziert. In Stämmen, die eine Insertion im *ip*-Locus tragen, ist das entsprechende Konstrukt, wenn nicht anders gekennzeichnet, in einfacher Kopie inseriert. Die Plasmide zur Herstellung der Stämme sind in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

**Tab. 3: Verwendete *U. maydis* Stämme.**

Stamm	Genotyp	Resistenz <sup>1</sup>	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
SG200	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i>	P	Kämper <i>et al.</i> , 2006
SG200Δkpp6	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6</i>	P, H	Brachmann <i>et al.</i> , 2003
SG200Δrok1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δrok1</i>	P, H	Di Stasio <i>et al.</i> , 2009
SG200AM1	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>R</sup> [P<sub>um01779</sub>:egfp(3x)]ip<sup>S</sup></i>	P, C	Mendoza-Mendoza <i>et al.</i> , 2009b
SG200Δsho1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1</i>	P, H	Lanver <i>et al.</i> , 2010
SG200Δmsb2	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2</i>	P, H	Lanver <i>et al.</i> , 2010
SG200sho1-GFP	<i>a1:mfa2 bW2bE1 sho1:egfp</i>	P, H	Lanver <i>et al.</i> , 2010
SG200mCherry-HA <sup>con</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1</i> <i>ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:mcherry:ha]ip<sup>S</sup></i>	P, C	P. Berndt, pers. Mitteilung

<sup>1</sup> Phleomycin (P), Hygromycin (H), Nourseothricin (N), Carboxin (C)

**Tab. 4: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis* Stämme.**

Stamm	Genotyp	Resistenz <sup>1</sup>
FB1Δsho1	<i>a1 b1 Δsho1</i>	N
FB1Δmsb2	<i>a1 b1 Δmsb2</i>	H
FB1Δsho1Δmsb2	<i>a2 b2 Δsho1Δmsb2</i>	N, C
FB2Δsho1	<i>a2 b2 Δsho1</i>	N
FB2Δmsb2	<i>a2 b2 Δmsb2</i>	H
FB2Δsho1Δmsb2	<i>a2 b2 Δsho1Δmsb2</i>	N, C
SG200Δsho1Δkpp6	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1Δkpp6</i>	P, H, C
SG200Δsho1Δmsb2	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1Δmsb2</i>	P, H, N
SG200Δsho1/sho1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1 ip<sup>R</sup> [P<sub>sho1</sub>:sho1] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δmsb2/msb2	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2 ip<sup>R</sup> [P<sub>msb2</sub>:msb2] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δsho1Δmsb2/sho1/msb2	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1Δmsb2 ip<sup>R</sup> [P<sub>sho1</sub>:sho1 P<sub>msb2</sub>:msb2] ip<sup>S</sup></i>	P, H, N, C
SG200AM1Δsho1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1 ip<sup>R</sup> [P<sub>um01779</sub>:egfp(3x)] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200AM1Δmsb2	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2 ip<sup>R</sup> [P<sub>um01779</sub>:egfp(3x)] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200AM1Δsho1Δmsb2	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1Δmsb2 ip<sup>R</sup> [P<sub>um01779</sub>:egfp(3x)] ip<sup>S</sup></i>	P, H, N, C
SG200Δsho1Δmsb2Δrok1	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1Δmsb2Δrok1</i>	P, H, N, C
SG200fuz7DD	<i>a1:mfa2 bW2bE1 ip<sup>R</sup> [P<sub>crgi1</sub>:fuz7DD] ip<sup>S</sup></i>	P, C
SG200Δsho1Δmsb2/fuz7DD	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δsho1Δmsb2 ip<sup>R</sup> [P<sub>crgi1</sub>:fuz7DD] ip<sup>S</sup></i>	P, H, N, C
SG200Δkpp6/kpp6	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:myc:kpp6] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δkpp6/kpp6-mc*	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:myc:kpp6] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δkpp6/kpp6 <sup>P130A P131A</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:myc:kpp6<sup>P130A P131A</sup>] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δkpp6/kpp6 <sup>Δ1-169</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:myc:kpp6<sup>Δ1-169</sup>] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C
SG200Δsho1Δkpp6/kpp6	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6 Δsho1 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:myc:kpp6] ip<sup>S</sup></i>	P, H, N, C
SG200Δsho1Δkpp6/kpp6 <sup>P130A P131A</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6 Δsho1 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:myc:kpp6<sup>P130A P131A</sup>] ip<sup>S</sup></i>	P, H, N, C
SG200Δsho1Δkpp6/kpp6 <sup>Δ1-169</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δkpp6 Δsho1 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:myc:kpp6<sup>Δ1-169</sup>] ip<sup>S</sup></i>	P, H, N, C
SG200sho1-GFP/msb2-mCherry	<i>a1:mfa2 bW2bE1 sho1:egfp msb2:mcherry</i>	P, H, N
SG200Δmsb2/msb2-mCherry <sup>con</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2 ip<sup>R</sup> [P<sub>otef</sub>:msb2(aa421:ha):mcherry:ha] ip<sup>S</sup></i>	P, H, C

SG200sho1-GFP/msb2-mCherry <sup>con</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 sho1:egfp</i> <i>ip</i> <sup>R</sup> <i>[P<sub>otef</sub>:msb2(aa421:ha):mcherry:hajip]</i> <sup>S</sup>	P, H, C
SG200sho1-GFP/kpp6-mc*	<i>a1:mfa2 bW2bE1 sho1:egfp ip</i> <sup>R</sup> <i>[P<sub>otef</sub>:myc:kpp6]ip</i> <sup>S</sup>	P, H, C
SG200Δmsb2/msb2-HA-GFP <sup>con</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2</i> <i>ip</i> <sup>R</sup> <i>[P<sub>otef</sub>:msb2(aa709:ha):egfp]ip</i> <sup>S</sup>	P, H, C
SG200Δmsb2/msb2ΔC <sup>con</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2</i> <i>ip</i> <sup>R</sup> <i>[P<sub>otef</sub>:msb2(aa709:ha)<sup>Δ915-1140</sup>:mcherry:hajip]</i> <sup>S</sup>	P, H, C
SG200Δmsb2/msb2ΔN <sup>con</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2</i> <i>ip</i> <sup>R</sup> <i>[P<sub>otef</sub>:msb2<sup>Δ33-713</sup>:egfp]ip</i> <sup>S</sup>	P, H, C
SG200Δmsb2/ msb2ΔC <sup>con</sup> /msb2ΔN <sup>con</sup>	<i>a1:mfa2 bW2bE1 Δmsb2 ip</i> <sup>R</sup> <i>[P<sub>otef</sub>:msb2<sup>Δ33-713</sup>:egfp</i> <i>P<sub>otef</sub>:msb2(aa709:ha)<sup>Δ915-1140</sup>:mcherry:hajip]</i> <sup>S</sup>	P, H, C

<sup>1</sup> Phleomycin (P), Hygromycin (H), Nourseothricin (N), Carboxin (C)

\* Diese Stämme tragen eine multiple Kopie des *otef:myc:kpp6* Konstrukts im *ip*-Locus

#### 4.3.4 Oligonukleotide

In der Tabelle 5 werden alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Diese wurden zur Herstellung bzw. Sequenzierung von Plasmiden sowie für quantitative „real-time“ PCR verwendet.

**Tab. 5: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz (5' - 3') <sup>1</sup>	Verwendung <sup>2</sup>
oDL18	TATGGATCCTTATAGGAGCTGCATGTAGTTGC TGGG	Amplifizierung von <i>sho1</i> , führt <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein [R]
oDL19	TATCATATGCTCACCACAGAGGAGGACTCTGT GC	Amplifizierung von <i>sho1</i> ohne Transmembrandomänen, führt <i>Nde</i> I-Schnittstelle ein [F]
oDL27	AAGACCGGCAACAGGATTCAATC	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende des <i>nos</i> Terminators [R]
oDL30	GGGTCAGCTTGCCGTAGGTGG	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende von <i>gfp</i> [R]
oDL61	ATCTCGAACTCGTGGCCG	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende von <i>mcherry</i> [R]
oDL79	[P]GTGCCCCGACTATGCCGGCGCCAGTCCCTC CACTGCTCCCTCGT	Inverse PCR zur Integration von einem <i>ha</i> -Epitop in <i>msb2</i> (aa 421), enthält 3'-Hälfte von <i>ha</i> [F]
oDL80	[P]GTCGTAGGGGTAGGCTGCGCCGCTGTCAT CATCGCTGC	Inverse PCR zur Integration von einem <i>ha</i> -Epitop in <i>msb2</i> (aa 421), enthält 5'-Hälfte von <i>ha</i> [R]



oDL81	[P]GTGCCCCGACTATGCCGGCGCCTCGACTACT TCAGCCTCGTTGGACAC	Inverse PCR zur Integration von einem <i>ha</i> - Epitop in <i>msb2</i> (aa 709), enthält 3'-Hälfte von <i>ha</i> [F]
oDL82	[P]GTCGTAGGGGTAGGCTGCTCCATTGATGTC GGCTGTATTCTGC	Inverse PCR zur Integration von einem <i>ha</i> - Epitop in <i>msb2</i> (aa 709), enthält 5'-Hälfte von <i>ha</i> [R]
oDL105	GCGTGGGCAAACCGCTGGCGGCTAGCCCTGC GCCCCAAATCG	Mutagenese von <i>kpp6</i> (P130A P131A), führt <i>NheI</i> -Schnittstelle ein [F]
oDL106	CGATTGGGGCGCAGGGCTAGCCGCCAGCGG TTTGCCACGC	Mutagenese von <i>kpp6</i> (P130A P131A), führt <i>NheI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL109	GGGCTGGCTTAACTATGCGG	Sequenzierung, hybridisiert mit p123 5'- wärts des <i>otef</i> Promotors [F]
oDL110	GTGCCAGACTTTGTGTGTGCG	Sequenzierung, hybridisiert mit 3'-Ende des <i>otef</i> Promotors [F]
oDL111	ATAGGATCCAGGCCTGAGTGGCCATGACAGA GGAGGACTCTGTGCTTTATCCG	Amplifizierung von 0,6 kb von <i>sho1</i> , führt <i>BamHI</i> - und <i>SfiI</i> -Schnittstellen ein [F]
oDL112	TTATCCATGGTGGCCGCGTTGGCCCTAGGA GCTGCATGTAGTTGCTGGG	Amplifizierung von 0,6 kb von <i>sho1</i> , führt <i>NcoI</i> - und <i>SfiI</i> -Schnittstellen ein [R]
oDL114	AATACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG	Amplifizierung von <i>mcherry-ha</i> , führt <i>NcoI</i> - Schnittstelle ein [F]
oDL115	TATGCGGCCGCTTTAAGCGTAATCTGGAACAT CGTATGGGTA	Amplifizierung von <i>mcherry-ha</i> , führt <i>NotI</i> - Schnittstelle ein [R]
oDL116	TGACATATGTCGATTGCCAATGCCTC	Amplifizierung von <i>kpp6</i> , führt <i>NdeI</i> - Schnittstelle ein [F]
oDL117	TATGGATCCTCAACGAAGAAGCGGCTG	Amplifizierung von <i>kpp6</i> , führt <i>BamHI</i> - Schnittstelle ein [R]
oDL118	TGACATATGTCCCATTCTGCACTCCGC	Amplifizierung von <i>kpp6</i> ohne N-terminale Domäne, führt <i>NdeI</i> -Schnittstelle ein [F]
oDL119	TATGGATCCTCAGGAGGGCGGCACAGCAG	Amplifizierung von <i>kpp6</i> ohne Kinase- Domäne, führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL124	ATAGGCCTGAGTGGCCATGTTCTGTTTCGAC CCAAC	Amplifizierung von <i>msb2</i> , führt <i>SfiI</i> - Schnittstelle ein [F]
oDL125	TATGGCCGCGTTGGCCGCAAGGAGAACCGAG TTGCTCATC	Amplifizierung von <i>msb2</i> ohne Stop- Codon, führt <i>SfiI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL131	ATACCCGGGATGGAGGAGCAGAAGCTGATCT C	Amplifizierung von <i>myc</i> , führt <i>XmaI</i> - Schnittstelle und Start-Codon ein [F]
oDL132	TATGCGGCCGCTCAACGAAGAAGCGGCTGAA ATTC	Amplifizierung von <i>kpp6</i> , führt <i>NotI</i> - Schnittstelle ein [R]
oDL137	CCAGCACCTATGAAGCGTTCACC	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>kpp6</i> [F]
oDL138	CGCTGATCCTCGACGTGCTGG	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>kpp6</i> [F]
oDL140	CGGCTTATCACGATCCTG	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>kpp6</i> [F]
oDL141	AGATCCTCCTTGGTGATG	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>kpp6</i> [R]
oDL171	TATCCCGGGACCGTCGGCAAGTGCAGGGG	Amplifizierung des Signalpeptids von <i>msb2</i> , führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL172	ATACCCGGGCTGCAGGCCGACCACGGTC	Amplifizierung von <i>msb2</i> ohne Signalpeptid, führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein [F]

oDL173	TATTGGCCGCGTTGGCCGCCAAAAGACCAGC AGCCACAAG	Amplifizierung von <i>msb2</i> ohne C-terminale Domäne, führt <i>SfiI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL200	[P]TCAAACCTTCGTTCCAACCCAGGG	Amplifizierung von <i>MSB2</i> aus <i>S. cerevisae</i> [R]
oDL202	TATGGATCCTCAAAGGAGAACCGAGTTGCTCA TCATC	Amplifizierung von <i>msb2</i> , führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL204	ATACCCGGGGCCTCGTTGGACACTTCTCCAAAC C	Amplifizierung von <i>msb2</i> ohne extrazelluläre Domäne, führt <i>XmaI</i> -Schnittstelle ein [F]
oDL205	GCGTCTAGAAATGGTTCTGTTTCGACCCAACTT CC	Amplifizierung von <i>msb2</i> , führt <i>XbaI</i> -Schnittstelle ein [F]
oDL206	GCGTCTAGAAATGCAGTTTCCATTCGCTTGTCT CC	Amplifizierung von <i>MSB2</i> aus <i>S. cerevisae</i> , führt <i>XbaI</i> -Schnittstelle ein [F]
oDL207	TCCTCGTCATTGTTCTCGTTCCC	Sequenzierung, hybridisiert mit 3'-Ende des <i>ADH1</i> Promotors [F]
oDL208	ATTTCTGGCAAGGTAGACAAGCCG	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende des <i>ADH1</i> Terminators [R]
oDL209	AATTAAGAGGGCAAGAAGTGGCG	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende des <i>kpp6</i> -Terminators [R]
oDL215	GCGTCTAGAAATGCCAAGCAAGCGTGGTGGC	Amplifizierung von <i>sho1</i> , führt <i>XbaI</i> -Schnittstelle ein [F]
oDL216	TATGGATCCTTATAGGAGCTGCATGTAGTTGC TGGGC	Amplifizierung von <i>sho1</i> , führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL217	GCGTCTAGAAATGTCAATATCATCAAAGATAAGA CCAACCTCC	Amplifizierung von <i>SHO1</i> aus <i>S. cerevisae</i> , führt <i>XbaI</i> -Schnittstelle ein [F]
oDL218	TATGGATCCTTAACGATGCATTTCTTCTGGACC ATC	Amplifizierung von <i>SHO1</i> aus <i>S. cerevisae</i> , führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL225	CCCGTCTCGGCTGGTTCGATC	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [R]
oDL229	TATGGTACCCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG G	Amplifizierung des <i>nos</i> Terminators, führt <i>Acc65I</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL248	TATGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC CG	Amplifizierung von <i>gfp</i> , führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein [R]
oDL249	TCTACGCGTACCAGGCCAACGC	Amplifizierung von codierender Region von <i>sho1</i> , liegt über einer <i>MluI</i> -Schnittstelle [F]
oDL255	ATAGGTACCCGTACCGAGCTCGACTTTC	Amplifizierung des <i>otef</i> Promotors, führt <i>Acc65I</i> -Schnittstelle ein [F]
oOM1	TACACCTCATCATTCACGCTAACGC	Amplifizierung der 5'-Flanke von <i>msb2</i> [F]
oOM2	CACGGCCTGAGTGGCCAAAGAGACAAGTGGG AGGCTGACG	Amplifizierung der 5'-Flanke von <i>msb2</i> , führt <i>SfiI</i> -Schnittstelle ein [R]
oOM3	GTGGGCCATCTAGGCCTGTTTGCTTTGGTTGT AACGGAACG	Amplifizierung der 3'-Flanke von <i>msb2</i> , führt <i>SfiI</i> -Schnittstelle ein [F]
oOM4	TGTCTGGCTGCACCACTCTATTTACG	Amplifizierung der 3'-Flanke von <i>msb2</i> [R]
oAM284	GACGGCGCAAATCTTTGCAT	Amplifizierung von 1,0 kb der 3'-codierenden Region von <i>msb2</i> [F]

oAM288	GCCCCG <u>CATATGG</u> CTGATGAAGAAAGAGCACT	Amplifizierung des <i>msb2</i> Promotors, führt <i>NdeI</i> -Schnittstelle ein [F]
oAM290	GCCTG <u>CGGCGCGC</u> ATTAAAGGAGAACCGAGT TG	Amplifizierung von <i>msb2</i> , führt <i>NotI</i> -Schnittstelle ein [R]
oAM331	CACG <u>GCGCGCTTGG</u> CCCCGGTGGCGATCGAG CGAAGGAGAACCGAGTTGCTCAT	Amplifizierung von <i>msb2</i> ohne Stop-Codon, führt C-terminalen Linker und <i>SfiI</i> -Schnittstelle ein [R]
oAM332	GTTG <u>GCGCTGAGTGGC</u> CATCTAGTTTGGTGCTT CTTTT	Amplifizierung der 3'-Flanke von <i>msb2</i> , führt <i>SfiI</i> -Schnittstelle ein [F]
oAM333	GCATTCACTCGGCGTCCCATCCAGC	Amplifizierung der 3'-Flanke von <i>msb2</i> [R]
oAM337	GCTC <u>CATATG</u> TACAAAGCTCGCGCGCTCTACGC	Amplifizierung von <i>sho1</i> ohne Transmembrandomänen und Linker Region, führt <i>NdeI</i> -Schnittstelle ein [F]
oAM338	GATG <u>GATCCC</u> GCCGCTAGTCGGGCAGGTCGGT GCT	Amplifizierung von <i>sho1</i> ohne SH3-Domäne, führt <i>BamHI</i> -Schnittstelle ein [R]
oPB94	ACATCGTCAAGGCTATCG	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>ppi</i> [F]
oPB95	AAAGAACACCGGACTTGG	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>ppi</i> [R]
M13-fwd	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung, hybridisiert mit pCRII-TOPO
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung, hybridisiert mit pCRII-TOPO
pJET-fwd	TGGAGCAGGTTCCATTCATTG	Sequenzierung, hybridisiert mit pJET1
pJET-rev	GTTCTGATGAGGTGGTTAGCATAG	Sequenzierung, hybridisiert mit pJET1
hhn3	AACTCGCTGGTAGTTACCAC	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende der <i>hyg</i> -Kassette [R]
hhn5	ACTAGATCCGATGATAAGCTG	Sequenzierung, hybridisiert mit 3'-Ende der <i>hyg</i> -Kassette [F]
nat3	CCGCTTATCACTTCTAGG	Sequenzierung, hybridisiert mit 5'-Ende der <i>nat</i> -Kassette [R]
nat5	GACGCGTGACGCATGTAAC	Sequenzierung, hybridisiert mit 3'-Ende der <i>nat</i> -Kassette [F]
pGAD-rev	TGGTGACGATGCACAGTTGAAGTG	Sequenzierung, hybridisiert mit pGADT7
pGBD-rev	TTTTCGTTTTAAACCTAAGAGTC	Sequenzierung, hybridisiert mit pGBKT7
T7seq	TAATACGACTCACTATAGGGCG	Sequenzierung, hybridisiert mit T7 Promotor [F]
sho1-2	GAAGCCGATGGTGTGGCCG	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>sho1</i> [F]
sho1-3	CTACGGTAACAGTCCGTCGG	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>sho1</i> [F]
msb2-7.1	TTGTCCAAGCGATTTCTCCG	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [F]
msb2-8	CGATCCGCCTCAAATTCGCA	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [F]
msb2-9	CCACTGCCGACGGTGGTTTG	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [F]
msb2-9.1	TCACCATCGCATCGCAGCC	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [F]
msb2-12	GACGGCGCAAATCTTTGCAT	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [F]
msb2-13	TGTCACGTGCACACACCATT	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [F]
msb2-14	ACGACTATCGCGTTCCTCAC	Sequenzierung, hybridisiert mit <i>msb2</i> [F]

mfa1RT-F	GCTTTTCGATCTTCGCTCAGAC	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>mfa1</i> [F]
mfa1RT-R	CAACAACACAGCTGGAGTAGC	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>mfa1</i> [R]
GAPDH-F	CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>GAPDH</i> aus <i>Z. mays</i> [F]
GAPDH-R	TCCTTGCTGAGGGTCCGTC	Für qPCR verwendet, amplifiziert <i>GAPDH</i> aus <i>Z. mays</i> [R]

<sup>1</sup> Die Sequenz ist in 5' zu 3' Richtung angegeben; Oligonukleotide, die am 5'-Ende phosphoryliert sind, sind gekennzeichnet [P]; Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

<sup>2</sup> Das Oligonukleotid hybridisiert entweder mit dem *sense*-Strang [R] oder mit dem komplementären Strang [F] des jeweiligen Gens.

### 4.3.5 Plasmide

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide beschrieben. Alle Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Wurden Plasmidteile durch PCR amplifiziert, so wurde die Korrektheit der inserierten DNA-Sequenzen durch Sequenzierungen, die von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt wurden, abgesichert. Außer pGBKT7 und dessen Derivate, die eine Kanamycin-Resistenz-Kassette tragen, vermitteln alle Plasmide Ampicillin-Resistenz.

#### Plasmide zur Klonierung von PCR-Produkten

##### pCRII-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Ein Plasmid zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-Selektion verwendet.

##### pJet1-stuffer

(K. O. Schink und M. Bölker, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pJet1 (Fermentas, St. Leon-Rot). pJet1 ist ein linearisiertes Plasmid zur Klonierung von *blunt-end* DNA-Fragmenten. Re-zirkuliertes pJet1 exprimiert nach Transformation in *E. coli* ein letales Restriktionsenzym (Eco47IR). Das hier verwendete Derivat enthält eine 0,6 kb Schutzsequenz im ORF von *eco47IR* und kann daher in *E. coli* vermehrt werden. Die Schutzsequenz kann zur Klonierung von DNA-Fragmenten mit *EcoRV* ausgeschnitten werden.

#### Plasmide zur Generierung von stabilen *U. maydis* Mutanten

##### pMF5-n (Becht *et al.*, 2006)

Dieses Plasmid enthält *gfp* unter der Kontrolle des *nos* Terminators. Durch Restriktion mit *SfiI* kann ein 2,4 kb Fragment isoliert werden, welches das *gfp-T<sub>nos</sub>* Konstrukt sowie eine Nourseothricin-Resistenzkassette enthält. Mit diesem Fragment können C-terminale *gfp*-Fusionen für die Integration in die natürlichen Loci der jeweiligen Gene hergestellt werden.

##### pMF1-n (Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses Plasmid enthält eine Nourseothricin-Resistenzkassette, die durch Restriktion mit *SfiI* als 1,4 kb Fragment isoliert werden kann.

##### pMF5-mCherry (diese Arbeit)

Ein 0,7 kb *NcoI/BsrGI* Fragment, das für das rot fluoreszierende Protein mCherry (Shaner *et al.*, 2004) codiert wurde freundlicherweise von M. Bölker zur Verfügung gestellt und mit dem 4,6

kb *NcoI/BsrGI* Fragment aus pMF5-n ligiert. Damit wurde *gfp* durch *mcherry* ersetzt.

#### P123 (Aichinger et al., 2003)

Enthält das *gfp* Gen unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des *nos* Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

#### pONG (diese Arbeit)

Für die Herstellung dieses Plasmids wurde ein 0,7 kb *mcherry-ha* Fragment aus pP<sub>otef</sub>:vcp1-mCherry-HA mit oDL114 und oDL115 amplifiziert und mit *NcoI* und *NotI* geschnitten. Ein zweites 0,6 kb Fragment wurde mit oDL111 und oDL112 aus pP<sub>sho1</sub>:sho1 amplifiziert und mit *BamHI* und *NcoI* geschnitten. Anschließend wurde eine Drei-Fragment Ligation mit beiden Fragmenten und dem 5,5 kb *BamHI/NotI* Fragment aus p123 durchgeführt. In dem entstandenen Plasmid entsteht nach *SfiI* Restriktion ein 0,6 kb Fragment, welches durch entsprechende *SfiI* Fragmente ersetzt werden kann. Damit lassen sich C-terminale Fusionen an *mcherry-ha* herstellen, die unter der Kontrolle des *otef* Promotors stehen. pONG kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

#### pING (diese Arbeit)

pING ist eine Derivat von pONG, in dem das über *NcoI/NotI* Restriktion erzeugte 0,7 kb *mcherry-ha* Fragment aus pONG durch ein 0,7 kb *NcoI/NotI* *gfp*-Fragment aus p123 ersetzt wurde.

#### pP<sub>otef</sub>:vcp1-mCherryHA (A. Djamei, pers. Mitteilung)

Enthält das für einen sekretierten Effektor codierende *vcp1* Gen als C-terminale *mcherry-ha* Fusion. Dieses Plasmid wurde als Matrize für die Amplifikation von *mcherry-ha* verwendet.

#### pP<sub>otef</sub>:kpp6NA (Brachmann, 2001)

Diese Plasmid enthält den *otef* Promotor gefolgt von 81 bp des 5' nicht translatierten Bereichs von *kpp6*, dem gesamten *kpp6* ORF

und 435 bp des 3' nicht translatierten Bereichs. Damit steht *kpp6* unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des natürlichen Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pP<sub>crg1</sub>:fuz7DD (Müller et al., 2003)

Ein p123 Derivat, welches das konstitutiv aktive *fuz7DD*-Allel unter der Kontrolle des *crg1* Promotors enthält. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pAM1 (Mendoza-Mendoza et al., 2009b)

Dieses Plasmid enthält eine transkriptionelle Fusion des *um01779* Promotors an *3xgfp*. Das Plasmid kann mit *AgeI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

#### pArok1-Cbx (Di Stasio et al., 2009)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Carboxin Resistenzkassette aus pBS-Cbx (Kämper, 2004) flankierend von je 1,2 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *rok1*, enthält. Das Plasmid kann mit *HindIII* und *EcoRV* geschnitten werden und für die Deletion von *rok1* verwendet werden.

#### pAsho1-Hyg (Lanver et al., 2010)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *sho1*, enthält. Das Plasmid kann mit *PstI* und *BamHI* geschnitten werden und für die Deletion von *sho1* in *U. maydis* verwendet werden.

#### pAsho1-Nat (diese Arbeit)

Ein Derivat von pAsho1-Hyg, in dem die 2,7 kb Hygromycin-Resistenzkassette über *SfiI* Schnittstellen gegen eine 1,4 kb Nourseothricin-Resistenzkassette aus pMF1-n getauscht wurde. Das Plasmid kann mit *PstI* und *BamHI* geschnitten werden und für die Deletion von *sho1* in *U. maydis* benutzt werden.

pAmsb2-Hyg (Lanver *et al.*, 2010)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *msb2*, enthält. Das Plasmid kann mit *HindIII* und *XbaI* geschnitten werden und für die Deletion von *msb2* in *U. maydis* verwendet werden.

pAmsb2-Cbx (Lanver *et al.*, 2010)

Ein Derivat von pAmsb2-Hyg, in dem in dem die 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette über *SfiI* Schnittstellen gegen eine 1,9 kb Carboxin-Resistenzkassette aus pBS-Cbx getauscht wurde. Das Plasmid kann mit *EcoRI* geschnitten werden und für die Deletion von *msb2* in *U. maydis* benutzt werden.

pAmsb2-Nat (diese Arbeit)

Für dieses Plasmid wurde die 1,0 kb 5'-Flanke von *msb2* mit oOM1 und oOM2 amplifiziert. Die entsprechende 1,0 kb 3'-Flanke wurde mit oOM3 und oOM4 amplifiziert. Beide Fragmente wurden mit *SfiI* geschnitten und mit der 1,4 kb Nourseothricin-Resistenzkassette aus pMF1-n ligiert. Das Ligationsprodukt wurde mit dem 3,0 kb *EcoRV*-Fragment aus pJet1-stuffer ligiert. Das entstandene Plasmid kann mit *BspEI* und *PvuII* geschnitten werden und für die Deletion von *msb2* in *U. maydis* benutzt werden.

pP<sub>sho1</sub>:sho1 (Lanver *et al.*, 2010)

Ein p123 Derivat, das *sho1* unter der Kontrolle des natürlichen Promotors und des *nos* Terminators enthält. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

pP<sub>msb2</sub>:msb2 (diese Arbeit)

Hergestellt für die Komplementation von *msb2* Mutanten. Ein 6,9 kb Fragment, das den *msb2* ORF und Promotor (3,5 kb des 5' nicht translatierten Bereichs von *msb2*) enthielt wurde mit oAM288 und oAM290 amplifiziert, mit *NdeI* und *NotI* geschnitten und anschließend mit dem 4,5 kb *NdeI/NotI* Fragment aus p123 ligiert. Damit steht *msb2* unter der Kontrolle des natürlichen Promotors und des *nos* Terminators. Das Plasmid kann mit

*SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

pP<sub>sho1</sub>:sho1-P<sub>msb2</sub>:msb2 (diese Arbeit)

Hergestellt für die Komplementation von *sho1/msb2* Doppelmутanten. Ein 2,3 kb *PvuII/HpaI* Fragment aus pP<sub>sho1</sub>:sho1, das *sho1* und 0,8 kb des *sho1* Promotors enthielt, wurde in *HpaI*-linearisiertes pP<sub>msb2</sub>:msb2 integriert. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

psho1-GFP (Lanver *et al.*, 2010)

Dieses Plasmid enthält 1,0 kb des 3'-codierenden Bereichs von *sho1*, fusioniert über einen Linker, der für die Aminosäuren PVAIERANAAT codiert, an *gfp*. Dahinter liegen der *nos* Terminator sowie eine Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde als Matrize für die Amplifikation von *sho1-gfp* verwendet.

pmsb2-mCherry (diese Arbeit)

Hergestellt für eine C-terminale Fusion von *msb2* an *mcherry* im natürlichen Locus. Ein 1,0 kb Fragment, das die 3'-codierende Region von *msb2* enthielt wurde mit oAM331 und oAM284 amplifiziert und ein 1,0 kb Fragment, das die 3'-Flanke von *msb2* enthielt wurde mit oAM332 und oAM333 amplifiziert. Beide Fragmente wurden mit *SfiI* geschnitten und mit dem 2,4 kb *SfiI* Fragment aus pMF5-n ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in pCRII-TOPO kloniert. Damit wurde *msb2* über einen Linker, der für die Aminosäuren RSIATGANAAT codiert, an *mcherry* fusioniert. Das entstandene Plasmid vermittelt Nourseothricin Resistenz, kann mit *SnaBI* und *PmeI* geschnitten werden und anschließend in den *msb2*-Locus von *U. maydis* integriert werden.

pP<sub>otef</sub>:msb2-mCherry (diese Arbeit)

Hergestellt für eine konstitutiv starke Expression von *msb2-mcherry*. Es wurden zwei Fragmente (2,2 kb und 1,3 kb) mit den Oligonukleotid-Paaren oDL79/oDL125 und oDL80/oDL124 amplifiziert. Als Matrize wurde pP<sub>msb2</sub>:msb2 verwendet. Beide Fragmente wurden mit *SfiI* geschnitten und

zusammen mit dem 6,3 kb *SfiI* Fragment aus pONG ligiert. Damit wurde ein *ha*-Epitop in *msb2* integriert (Aminosäure 421) und das Gen zudem C-terminal an *mcherry-ha* fusioniert. Die Expression des Gens steht unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des *nos* Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pP<sub>otef</sub>:msb2-HA-GFP (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *msb2-ha-gfp*. Es wurden zwei Fragmente (1,4 kb und 2,1 kb) mit den Oligonukleotid-Paaren oDL81/oDL125 und oDL82/oDL124 amplifiziert. Als Matrize wurde pP<sub>msb2</sub>:msb2 verwendet. Beide Fragmente wurden mit *SfiI* geschnitten und zusammen mit dem 6,3 kb *SfiI* Fragment aus pING ligiert. Damit wurde ein *ha*-Epitop in *msb2* integriert (Aminosäure 709) und das Gen zudem C-terminal an *gfp* fusioniert. Die Expression des Gens steht unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des *nos* Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pP<sub>otef</sub>:msb2ΔC (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von C-terminal verkürztem *msb2*. Es wurden zwei Fragmente (0,1 kb und 2,7 kb) mit den Oligonukleotid-Paaren oDL124/oDL171 und oDL172/oDL173 amplifiziert. Als Matrize wurde pP<sub>otef</sub>:msb2-HA-GFP verwendet. Beide Fragmente wurden mit *SfiI* und *XmaI* geschnitten und zusammen mit dem 6,3 kb *SfiI* Fragment aus pONG ligiert. Damit wurde der cytoplasmatische C-Terminus von *msb2-ha-gfp* (Aminosäuren 915 – 1140 in Bezug auf das Wildtyp Protein) durch *mcherry-ha* substituiert. Die Expression des Gens steht unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des *nos* Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pP<sub>otef</sub>:msb2ΔN (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von N-terminal verkürztem *msb2*. Es wurden zwei Fragmente (0,1 kb und 1,3 kb) mit den Oligonukleotid-Paaren oDL124/oDL171 und oDL204/oDL125

amplifiziert. Als Matrize wurde pP<sub>otef</sub>:msb2-HA-GFP verwendet. Beide Fragmente wurden mit *SfiI* und *XmaI* geschnitten und zusammen mit dem 6,3 kb *SfiI* Fragment aus pING ligiert. Damit wurde nahezu die gesamte extrazelluläre Domäne von *msb2-ha-gfp* (Aminosäuren 33 - 713 in Bezug auf das Wildtyp Protein) deletiert. Die Expression des Gens steht unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des *nos* Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pP<sub>otef</sub>:msb2ΔN-P<sub>otef</sub>:msb2ΔC (diese Arbeit)

Hergestellt für die gleichzeitige Expression von *msb2ΔC* und *msb2ΔN*. Das 3,3 kb *otef*-*msb2ΔN-nos* Konstrukt wurde mit oDL255 und oDL229 amplifiziert, mit *Acc65I* geschnitten und in *Acc65I*-linearisiertes pP<sub>otef</sub>:msb2ΔC integriert. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pP<sub>otef</sub>:myc-kpp6 (diese Arbeit)

Hergestellt für die konstitutive Expression von *kpp6*. Es wurde pGBKT7-kpp6 als Matrize für eine PCR eingesetzt und das 1,1 kb *myc-kpp6* Fusionsgen mit oDL131 und oDL132 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *SmaI* und *BspEI* geschnitten und mit dem 6.0 *BspEI/SmaI* Fragment aus pP<sub>otef</sub>:kpp6NA ligiert. Damit steht *myc-kpp6* unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des natürlichen Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

#### pP<sub>otef</sub>:myc-kpp6<sup>Δ170-533</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die konstitutive Expression von *kpp6*<sup>Δ170-533</sup>. Es wurde pGBKT7-kpp6<sup>Δ170-533</sup> als Matrize für eine PCR eingesetzt und das 0,6 kb *myc-kpp6*<sup>Δ170-533</sup> Fusionsgen mit oDL131 und oDL132 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *SmaI* und *BspEI* geschnitten und mit dem 6.0 *BspEI/SmaI* Fragment aus pP<sub>otef</sub>:kpp6NA ligiert. Damit steht *myc-kpp6*<sup>Δ170-533</sup> unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des natürlichen Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

pP<sub>otef</sub>:myc-kpp6<sup>P130A P131A</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die konstitutive Expression von *kpp6<sup>P130A P131A</sup>*. Es wurde pGBKT7-kpp6<sup>P130A P131A</sup> als Matrize für eine PCR eingesetzt und das 1,1 kb *myc-kpp6<sup>P130A P131A</sup>* Fusionsgen mit oDL131 und oDL132 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *SmaI* und *BspEI* geschnitten und mit dem 6.0 *BspEI/SmaI* Fragment aus pP<sub>otef</sub>:kpp6NA ligiert. Damit steht *myc-kpp6<sup>P130A P131A</sup>* unter der Kontrolle des *otef* Promotors und des natürlichen Terminators. Das Plasmid kann mit *SspI* linearisiert werden und in den *ip*-Locus von *U. maydis* inseriert werden.

**Plasmide für *S. cerevisiae***pGBKT7

(Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich)  
Dieses Plasmid enthält die *GAL4*-Bindedomäne gefolgt von einem *myc*-Epitop. Es wurde für die Herstellung von N-terminalen *GAL4BD*-*myc*-Fusionen mit verschiedenen im Hefe Zwei-Hybrid-System zu testenden Genen verwendet (Köderplasmid). Das Plasmid vermittelt eine Kanamycin-Resistenz und enthält den *TRP1* Auxotrophiemarker.

pGADT7

(Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich)  
Dieses Plasmid enthält die *GAL4*-Aktivierungsdomäne gefolgt von einem *ha*-Epitop. Es wurde für die Herstellung von N-terminalen *GAL4AD*-*ha*-Fusionen mit verschiedenen im Hefe Zwei-Hybrid-System zu testenden Genen verwendet (Beutegene). Das Plasmid enthält den *LEU2* Auxotrophiemarker.

pGBKT7-hog1

(Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a)

Enthält das *U. maydis hog1* Gen (*um02375*) fusioniert an die *GAL4*-Bindedomäne. Dieses Plasmid wurde für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse eingesetzt.

pGBKT7-slt2

(Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a)

Enthält das *U. maydis slt2* Gen (*um10107*) fusioniert an die *GAL4*-Bindedomäne. Dieses

Plasmid wurde für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse eingesetzt.

pGBKT7-kpp2

(Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a)

Enthält das *U. maydis kpp2* Gen (*um03305*) fusioniert an die *GAL4*-Bindedomäne. Dieses Plasmid wurde für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse eingesetzt.

pGBKT7-kpp6

(Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009a)

Enthält das *U. maydis kpp6* Gen (*um02331*) fusioniert an die *GAL4*-Bindedomäne. Dieses Plasmid wurde für die Hefe Zwei-Hybrid-Analyse eingesetzt.

pGBKT7-kpp6<sup>1-170</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *kpp6<sup>1-170</sup>* im Hefe Zwei-Hybrid-System. Es wurde pGBKT7-kpp6 als Matrize für eine PCR eingesetzt und die für Aminosäuren 1 - 170 codierende Region von *kpp6* mit oDL116 und oDL119 amplifiziert. Das entstandene 0,5 kb Fragment wurde mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 7,3 kb *NdeI/BamHI*-Fragment aus pGBKT7 ligiert. Damit wurde *kpp6<sup>1-170</sup>* an die *GAL4*-Bindedomäne fusioniert.

pGBKT7-kpp6<sup>170-533</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *kpp6<sup>170-533</sup>* im Hefe Zwei-Hybrid-System. Es wurde pGBKT7-kpp6 als Matrize für eine PCR eingesetzt und die für Aminosäuren 170 - 533 codierende Region von *kpp6* mit oDL117 und oDL118 amplifiziert. Das entstandene 1,1 kb Fragment wurde mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 7,3 kb *NdeI/BamHI*-Fragment aus pGBKT7 ligiert. Damit wurde *kpp6<sup>170-533</sup>* an die *GAL4*-Bindedomäne fusioniert.

pGBKT7-kpp6<sup>P130A P131A</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *kpp6<sup>P130A P131A</sup>* im Hefe Zwei-Hybrid-System. Die Substitutionen von P130A und P131A in *kpp6* wurden mittels QuickChange Site-Directed-Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla/USA) unter Verwendung der komplementären Oligonukleotide oDL105 und oDL106



durchgeführt. Als Matrize wurde pGBKT7-kpp6 verwendet.

pGADT7-sho1<sup>131-335</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *sho1*<sup>131-335</sup> im Hefe Zwei-Hybrid-System. Es wurde pP<sub>sho1</sub>:sho1 als Matrize für eine PCR eingesetzt und die für Aminosäuren 131 - 335 codierende Region von *sho1* mit oDL19 und oDL18 amplifiziert. Das entstandene 0,6 kb Fragment wurde mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 7,9 kb *NdeI/BamHI*-Fragment aus pGADT7 ligiert. Damit wurde *sho1*<sup>131-335</sup> an die *GAL4*-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-sho1<sup>131-278</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *sho1*<sup>131-278</sup> im Hefe Zwei-Hybrid-System. Es wurde pP<sub>sho1</sub>:sho1 als Matrize für eine PCR eingesetzt und die für Aminosäuren 131 - 278 codierende Region von *sho1* mit oDL19 und oAM338 amplifiziert. Das entstandene 0,5 kb Fragment wurde mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 7,9 kb *NdeI/BamHI*-Fragment aus pGADT7 ligiert. Damit wurde *sho1*<sup>131-278</sup> an die *GAL4*-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pGADT7-sho1<sup>279-335</sup> (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *sho1*<sup>279-335</sup> im Hefe Zwei-Hybrid-System. Es wurde die für Aminosäuren 279 - 335 codierende Region von *sho1* aus pP<sub>sho1</sub>:sho1 mit oAM337 und oDL18 amplifiziert. Das entstandene 0,2 kb Fragment wurde mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 7,9 kb *NdeI/BamHI*-Fragment aus pGADT7 ligiert. Damit wurde *sho1*<sup>279-335</sup> an die *GAL4*-Aktivierungsdomäne fusioniert.

pVTU260 (Euroscarf, Frankfurt)

Dieses Plasmid enthält den *ADHI* Promotor und wurde sowohl als Kontrollplasmid als auch als Ausgangsplasmid für die Expression von Genen in *S. cerevisiae* verwendet. Das Plasmid enthält den *URA3* Auxotrophiemarker.

pVTU260-Um-msb2-HA (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *U. maydis* *msb2-ha* in *S. cerevisiae*. Es wurde pP<sub>otef</sub>:msb2-HA-GFP als Matrize für eine PCR eingesetzt und das 3,4 kb *msb2-ha* Fragment mit den

Oligonukleotiden oDL205 und oDL202 amplifiziert, mit *XbaI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 6,9 kb *NheI/BamHI*-Fragment aus pVTU260 ligiert. Damit steht *msb2-ha* unter der Kontrolle des *ADHI* Promotors.

pVTU260-Sc-MSB2 (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *S. cerevisiae* *MSB2*. Der 3,9 kb *MSB2* ORF wurde mit oDL200 und oDL206 amplifiziert. Als Matrize wurde  $\Sigma$ 1278b DNA verwendet, die freundlicherweise von H. U. Mösch zur Verfügung gestellt wurde. Das 3,9 kb Fragment wurde mit *XbaI* geschnitten und mit dem 6,9 kb *NheI/BamHI*-Fragment aus pVTU260 ligiert. Damit steht *S. cerevisiae* *MSB2* unter der Kontrolle des *ADHI* Promotors.

pVTU260-Um-sho1 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid diente als Hilfsvektor für die Herstellung von pVTU260-sho1-GFP. Da *sho1* ein Intron enthält (bp 41 - 141; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) wurde *U. maydis* cDNA als Matrize für die Amplifikation von *sho1* verwendet. Mit den Oligonukleotiden oDL215 und oDL216 wurde der 1,0 kb ORF von *sho1* amplifiziert, mit *XbaI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 6,9 kb *NheI/BamHI* Fragment aus pVTU260 ligiert.

pVTU260-Um-sho1-GFP (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *U. maydis* *sho1-gfp* in *S. cerevisiae*. Es wurde psho1-GFP als Matrize für eine PCR eingesetzt und 0,9 kb der 3'-codierenden Region von *sho1-gfp* mit oDL248 und oDL249 amplifiziert. Das Fragment wurde mit *MluI* und *BamHI* geschnitten und mit dem 7,7 kb *MluI/BamHI*-Fragment aus pVTU260-sho1 ligiert. Damit wurde der *sho1* ORF an *gfp* fusioniert. In *S. cerevisiae* wird das Fusionsgen unter der Kontrolle des *ADHI* Promotors exprimiert.

pVTU260-Sc-SHO1 (diese Arbeit)

Hergestellt für die Expression von *S. cerevisiae* *SHO1*. Der 1,1 kb *SHO1* ORF wurde mit oDL217 und oDL218 amplifiziert. Als Matrize wurde  $\Sigma$ 1278b DNA verwendet, die freundlicherweise von H. U. Mösch zur Verfügung gestellt wurde. Das 0,9 kb Fragment

wurde mit *Xba*I und *Bam*HI geschnitten und mit dem 6,9 kb *Nhe*I/*Bam*HI-Fragment aus pVTU260 ligiert. Damit steht *S. cerevisiae*

*SHO1* unter der Kontrolle des *ADHI* Promotors.

## 4.4 Mikrobiologische Methoden

### 4.4.1 Induktion von Filamenten und Appressorien *in vitro*

Die *in vitro* Induktion von *b*-Filamenten und Appressorien wurde nach Mendoza-Mendoza *et al.* (2009) mit leichten Veränderungen durchgeführt. Als Oberfläche wurde in der Regel Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago/USA) verwendet. Nur für Lokalisationsstudien von Sho1-GFP und Msb2-mCherry wurde Paraffin-Wachs (Granopent; Roth, Karlsruhe) verwendet. Das Paraffin Granulat wurde im Wasserbad bei 100°C geschmolzen, flüssig auf einen Objektträger aufgebracht und mit Hilfe einer hydrophilen VPS-Oberfläche (hergestellt mit Garant L; 3M ESPE, Neuss) zu einer glatten Oberfläche gepresst.

Die jeweiligen Stämme wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt, die Zellen geerntet (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R) und in 2% YEPSL (in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt. Diese Zellsuspensionen wurden mit 100 µM 16-Hydroxy-Palmitinsäure (HPS; 16-hydroxy hexadecanoic acid; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) versetzt. Dafür wurde eine 10 mM Stammlösung (in Ethanol) 1:100 mit der Zellsuspension verdünnt. Als Kontrolle wurde zu Zellsuspensionen die entsprechende Menge Ethanol zugeführt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend auf die Oberflächen aufgesprüht (EcoSpray; Roth, Karlsruhe). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Tropfen nicht größer als 1 mm waren. Die so inokulierten Oberflächen wurden in rechteckige Petrischalen auf ein feuchtes Filterpapier platziert und die Petrischalen mit Parafilm versiegelt. Die Proben wurden in der Regel für 18 h bei 28°C inkubiert. Um Filamentbildung zu quantifizieren, wurde die Anzahl der filamentös wachsenden Zellen relativ zu der Gesamtzahl der Zellen mikroskopisch bestimmt. Für die Quantifizierung von Appressorien wurde die Anzahl der Filamente, die eine Verdickung der Filamentspitze sowie eine Expression des Appressorien-spezifischen GFP-Reporters aufwiesen, bestimmt und dieser Wert relativ zur Gesamtzahl der Filamente dargestellt. Für die Analyse von Appressorien wurden nicht adhärierende Zellen mit Wasser abgewaschen.

Um Filamentbildung in Flüssigkultur zu induzieren, wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und vorbereitet. Die Zellsuspensionen wurden daraufhin in 2 ml

Reaktionsgefäßen auf einem Roll-Inkubator (Kisker, Steinfurt) bei 20 Upm in nahezu waagerechter Position gedreht. Nach 18 h Inkubation bei 28°C wurde die Filamentbildung mikroskopisch analysiert und wie oben beschrieben quantifiziert. Alle quantitativen Analysen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

#### 4.4.2 Infektion von *Z. mays* mit *U. maydis*

Um die Virulenz von *U. maydis* Stämmen zu überprüfen, wurden Kulturen über Nacht in YEPSL bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen. Dann wurde die Zellen geerntet (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R) und in sterilem Wasser auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. Kompatible Stämme wurden vor der Infektion im Verhältnis von 1:1 gemischt. Bei Stämmen, die das *P<sub>crg1</sub>:fuzDD*-Konstrukt trugen, wurde den Zellsuspensionen Glucose bzw. Arabinose zu einer Konzentration von 1% zugeführt. Es wurden Spritzinfektionen durchgeführt, in denen 500 µl der Zellsuspensionen in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam (Olds Seeds, Madison/USA) injiziert wurden. Die Injektionsstelle wurde etwa 1 cm über der Erde gewählt, also etwa 2,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Dabei wurden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen. Die Pflanzen wurden in einem Gewächshaus bei 28°C (Tag) und 20°C (Nacht) kultiviert. Die Beleuchtung betrug während der Tag Phase mindestens 28.000 Lux (bei zusätzlicher Sonneneinstrahlung bis zu 90.000 Lux) und die relative Luftfeuchtigkeit lag zwischen 40 und 60%.

**Tab. 6: Klassifizierung der Symptome von Maispflanzen nach Infektion mit *U. maydis*.**

Pflanzensymptom	Beschreibung
Nekrosen	Blätter zeigen leichte nekrotische Läsionen, keine weiteren Symptome sichtbar
Chlorosen	Pflanze zeigt gelblich-bleiche Verfärbungen an infizierten Blättern
Ligula Schwellung	Pflanze zeigt leichte Schwellungen der Ligula
Kleine Tumore	Die größten Tumore der Pflanze sind < 2 mm
Große Tumore	Die Tumore der Pflanze sind > 2 mm
Tumor-induzierte Entwicklungsstörung	Sehr starke Tumorbildung, die häufig mit einer Verkrümmung der Sprossachse einhergeht
Tot	Die Pflanze ist aufgrund der Infektion gestorben

Für die Quantifizierung von Pathogenitätssymptomen wurden zwölf Tage nach Infektion die Symptome je nach Stärke in sieben verschiedene Kategorien klassifiziert (Tab. 6; modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006). In der Regel wurden je Stamm drei unabhängige Infektionen mit 30 - 40 Pflanzen durchgeführt. Die Werte wurden anschließend gemittelt und prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen dargestellt.

#### 4.4.3 Transformation

##### 4.4.3.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 10 mM  $\text{MgSO}_4$  versetzt. Dieses Medium wurde mit 1 ml einer frischen TOP10 Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3.000 Upm, 15 min, -4°C; Heraeus Varifuge 3.0R) und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3.000 Upm, 15 min, -4°C; Heraeus Varifuge 3.0R), die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mM K-Acetat 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 15% (v/v) Glycerin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ , pH 5,8 (mit Acetat); sterilfiltriert
RF2-Lösung	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 15% (v/v) Glycerin in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ , pH 5,8 (mit NaOH); sterilfiltriert

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1 - 5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz (bis zu 1 µg DNA) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid-vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 - 60

min bei 800 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven YT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.4.3.2 Transformation von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde in YEPD bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Es wurden die Zellen einer 50 ml Kultur geerntet (2.000 Upm, 3 min; Heraeus Variofuge 3.0R) und in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml SORB äquilibriert, erneut abzentrifugiert und in 360 µl SORB aufgenommen. Dann wurden 60 µl einer Hitze-denaturierten DNA-Lösung (10 mg/ml salmon sperm DNA; Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden direkt transformiert oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt.

SORB	100 mM Lithium-Acetat 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 1 M Sorbitol in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; sterilfiltriert
PEG	100 mM Lithium-Acetat 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 40% PEG3350 in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; sterilfiltriert

Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit bis zu 10 µl Plasmid-Lösung (etwa 1 µg DNA) und 360 µl PEG für 30 min bei 28°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 15 min bei 42°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (2.000 Upm, 3 min; Heraeus Biofuge 15) und zweimal in 1 ml YEPD gewaschen. Nach zweistündiger Inkubation in YEPD bei 30°C auf einem Eppendorf-Wärmeblock (700 Upm) wurde der Transformationsansatz auf entsprechendes SD-Selektionsmedium ausgestrichen. Nach etwa vier Tagen konnten Kolonien geerntet werden.

#### 4.4.3.3 Transformation von *U. maydis*

*U. maydis* wurde nach einem nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992) modifizierten Protokoll transformiert. Eine 50 ml Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> in YEPSL kultiviert und die Zellen anschließend geerntet (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R) Die Zellen wurden einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit

2,5 mg/ml Novozym 234 (Novo Nordisc; Kopenhagen, Dänemark) resuspendiert. Die so gestartete Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt. Nachdem etwa 50 - 70% der Zellen anprotoplastiert waren (5 - 15 min), wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Danach wurden die Zellen einmal mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet schließlich in 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten wurden direkt transformiert oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt.

SCS-Lösung	1 M Sorbitol in 20 mM Na-Citrat, pH 5,8; sterilfiltriert
STC-Lösung	100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; sterilfiltriert
STC/PEG-Lösung	40% PEG4000 in STC; sterilfiltriert
Regenerations-Agar	Top: 1,5% (w/v) Bactoagar 1 M Sorbitol in YEPSL Bottom: wie Top, zusätzlich zweifach konzentriertes Antibiotikum

Zur integrativen Transformation wurden 70 µl Protoplasten mit 10 µl linearisierter DNA (bis zu 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung (10 mg/ml) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation für 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit 10 ml Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen, die das entsprechende zweifach konzentrierte Antibiotikum in 10 ml Bottom-Agar enthielt. Nach drei bis fünf Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Southern-Analyse verifiziert.

## 4.5 Molekularbiologische Methoden

### 4.5.1 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

#### 4.5.1.1 Restriktion von DNA

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ II Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt) für 1 - 16 h bei enzymespezifischer Temperatur durchgeführt. Die Menge an eingesetzter DNA variierte dabei zwischen 0,5 µg und 5 µg. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen.

X µl DNA (0,5 - 5 µg)  
2 µl enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer  
2 µl 10 x BSA (NEB)  
0,5 U Restriktionsendonuklease  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.5.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA Ligase (Roche, Mannheim) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem DNA-Fragment verbunden werden sollte, wurde die entsprechende DNA im molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. In Ligationen, bei denen drei Fragmente zu einem linearen DNA-Molekül ligiert werden sollten, wurde ein molares Verhältnis von 1:1:1 eingesetzt. In der Regel wurden die Ligationen in 20 µl Ansätzen mit 1 U T4 DNA Ligase über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die insgesamt eingesetzte Menge an DNA variierte dabei zwischen 100 ng und 2 µg.

#### 4.5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt. Wenn zur Herstellung von Plasmiden nicht mehr als 5 kb amplifiziert werden mussten, wurde Phusion Polymerase verwendet. KOD Extreme Polymerase wurde für die inverse PCR auf Plasmide eingesetzt. Taq-Polymerase wurde für Test-PCRs benutzt.

Im Folgenden sind typische Ansätze für die einzelnen Polymerasen beschrieben. Außerdem wird das PCR Programm nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung - [Denaturierung - Anlagerung - Elongation] x Zahl der Zyklen - finale Elongation. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu amplifizierenden

Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase variiert. Die Anlagerungstemperatur der jeweils verwendeten Oligonukleotide wurde mittels des Programms VectorNTI 10.0 (Invitrogen) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in einer PTC-200 PCR-Maschine (Peletier Thermal Cycler, MJ Research) durchgeführt.

#### Phusion-Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt)

Ansatz            etwa 50 µg Matrizen-DNA  
                      250 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)  
                      1 µM Oligonukleotid 1  
                      1 µM Oligonukleotid 2  
                      1 x konzentrierter HF-Puffer (Finnzymes)  
                      0,5 U Phusion-Polymerase  
 Programm:      98°C/1 min - [98°C/30 s - 55-65°C/15 s - 72°C/15 s/kb] x 35 - 72°C/5 min

#### KOD Extreme Polymerase (Novozym/Merck, Darmstadt)

Ansatz            etwa 50 µg Matrizen-DNA  
                      250 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)  
                      1 µM Oligonukleotid 1  
                      1 µM Oligonukleotid 2  
                      1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen)  
                      1 U KOD-Extreme Polymerase  
 Programm:      94°C/2 min - [94°C/30 s - 55-65°C/15 s - 68°C/1 min/kb] x 35-40 - 68°C/10 min

#### Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth)

Ansatz            etwa 50 µg Matrizen-DNA  
                      250 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)  
                      1 µM Oligonukleotid 1  
                      1 µM Oligonukleotid 2  
                      1 x konzentrierter KCl-Puffer (Fermentas)  
                      1 U Taq-DNA-Polymerase  
 Programm:      94°C/5 min - [94°C/1 min - 55-65°C/1 min - 72°C/1 min/kb] x 35 - 72°C/10 min

## **4.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren**

### **4.5.2.1 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli***

Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe des QIAprep Mini Plasmid Kits nach Herstellerangaben isoliert. Für andere Anwendungen, wie beispielsweise Restriktionsanalysen, wurde Plasmid-DNA nach dem Prinzip der kochenden Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) extrahiert. Dazu wurden 1,5 ml einer *E. coli*



Übernachtskultur pelletiert (13.000 Upm, Heraeus Biofuge 15). Dem Zellpellet wurden 350 µl STET und 25 µl Lysozym-Lösung zugeführt, die Proben auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) für 1 min geschüttelt und anschließend 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 35 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 420 µl Isopropanol für 5 min gefällt und abzentrifugiert (13.000 Upm, 5 min; Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET-Puffer	50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 8% (w/v) Saccharose 5% (v/v) Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
TE-Puffer	1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

#### 4.5.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Diese Methode wurde nach Hoffman und Winston (1987) modifiziert. 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPSL wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (7.500 Upm, 3 min; Heraeus Biofuge 15), der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl *Ustilago*-Lysepuffer und 400 µl TE Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt und anschließend 15 min zentrifugiert (13.000 Upm; Heraeus Biofuge 15). Nach der Phasentrennung wurden 200 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 0,5 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min; Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min an der Luft getrocknet und in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Die Resuspendierung erfolge bei 65°C für etwa 15 min auf einem Eppendorf-Wärmeblock.

<i>Ustilago</i> -Lysepuffer	50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 1% (w/v) SDS in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
TE-Phenol/Chloroform	Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

#### 4.5.2.3 Isolierung genomischer DNA aus infizierten Maispflanzen

Es wurden sieben Tage alten Maispflanzen wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben mit *U. maydis* infiziert. Drei Tage nach Infektion wurden das dritte Blatt präpariert und mit flüssigem Latex (Orion, Deutschland) behandelt. Nach dem Trocknen wurde das Latex abgezogen, um pilzliches Material von der Blattoberfläche zu entfernen. Als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung wurden etwa 4 cm große Blattabschnitte unterhalb der Einstichlöcher verwendet und 10 solcher Blattabschnitte vereint. Diese Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einem Mörser zerkleinert. Das Material wurde anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,3 g Glasperlen, 400 µl *Ustilago*-Lysepuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform versetzt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Kapitel 4.5.2.2 beschrieben.

#### 4.5.2.4 Isolierung von *U. maydis* RNA aus axenischer Kultur

Für die Isolierung von RNA aus axenischer Kultur wurden Zellen in YEPSL bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und 10 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R). Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend 0,5 ml Aquaphenol/Chloroform, 0,5 ml AE-Puffer und 0,3 g Glasperlen zugegeben. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt, 10 min bei 60°C in einem Eppendorf-Thermoblock (800 Upm) inkubiert und anschließend für 10 min bei -80°C eingefroren. Danach erfolgte die Phasentrennung bei 4°C (13.000 Upm, 15 min; Heraeus Biofuge stratos). Die wässrige Phase wurde erneut mit 0,5 ml Aquaphenol/Chloroform versetzt und 15 min zentrifugiert (13.000 Upm, 4°C; Heraeus Biofuge stratos). Dann wurden 400 µl Überstand mit 1 ml Ethanol und 40 µl 3 M Na-Acetat gemischt und die RNA bei 22.000 Upm pelletiert (45 min, 4°C; Heraeus Biofuge stratos). Die RNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (22.000 Upm, 10 min, 4°C; Heraeus Biofuge stratos) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für 5 min an der Luft getrocknet und anschließend in 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) resuspendiert (20 min,

55°C). Im Anschluss wurden die Proben mit dem Turbo-DNAfree Kit (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers behandelt, mit dem Qiagen RNAeasy Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl RNase-freies Wasser eluiert. Die gewonnene RNA wurde mit einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer quantifiziert. Es konnten bis zu 50 µg Gesamt-RNA isoliert werden. Die qualitative Analyse der RNA wurde mittels Kapillar-Gelelektrophorese auf einem Agilent 2100-BioanalyzerR nach Herstellerangaben durchgeführt.

10 x AE-Puffer	Lösung I	500 mM Na-Acetat
		100 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
		in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
	Lösung II	500 mM Acetat
		100 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
		in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
	Lösung I und Lösung II in einem Verhältnis von etwa 6:1 mischen, pH 5,3	
Aquaphenol/Chloroform	Mischung aus gleichen Teilen Aquaphenol und Chloroform	

#### 4.5.2.5 Isolierung von *U. maydis* RNA aus Filamenten

Für die Isolierung von RNA aus adhäsiven Filamenten wurden 2 ml einer Zellsuspension ( $OD_{600} = 1,0$ ) wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben mit HPS bzw. Ethanol behandelt und auf 100 cm<sup>2</sup> große Parafilm-Streifen gesprüht. Nach Inkubation für 12 h bei 28°C wurde die mit Pilzhypen bewachsene Seite des Parafilms auf eine mit Wasser gefüllte Petrischale gelegt und durch 3-minütiges Schwenken nicht adhärierende Zellen entfernt. Auf die Oberfläche wurden anschließend 0,5 ml Aquaphenol/Chloroform gegeben und die adhäsiven Filamente mittels Zellschaber (Greiner Bio-one, Frickenhausen) geerntet. Nach Überführung dieser Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden 0,5 ml AE-Puffer zugegeben. Die weiteren Schritte zur Isolierung der RNA erfolgten wie in Kapitel 4.5.2.4 beschrieben. Mit dieser Methode konnten bis zu 500 ng Gesamt-RNA isoliert werden.

### 4.5.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

#### 4.5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Hierbei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung

in Richtung Anode. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele variierte zwischen 0,8% und 2,0%. Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1 x TAE oder 0,5 x TBE durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,25 µg/ml). Das Gel wurde in flüssigem Zustand etwa 1 cm hoch in eine Gelform (10 x 12 cm) gegossen, nach dem Erstarren in eine dafür vorgesehene Gelkammer transferiert und mit dem entsprechenden Puffer bedeckt. Die DNA wurde in Gelauftragspuffer aufgenommen, auf der Seite der Kathode auf das Gel geladen und bei 80 - 150 mA aufgetrennt. Als Größenstandard wurde 1 kb ladder (0,5 - 10 kb; NEB, Frankfurt) oder 100 bp ladder (0,1 - 1,5 kb; NEB, Frankfurt) verwendet. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung bei 254 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation fand mit einer Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System; UVP) statt.

5 x TBE-Puffer	440 mM Tris-Base 440 mM Borat 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 2 M Acetat 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
6 x Gelauftragspuffer (nicht-denaturierend)	50% (w/v) Saccharose 0,01% (w/v) Bromphenolblau in TE-Puffer

#### 4.5.3.2 Southern Analyse

Zunächst wurde die genomische DNA aus *U. maydis* Transformanten isoliert (siehe Kapitel 4.5.2.2) und etwa 5 µg der gewonnenen DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Enzyme wurden dabei so gewählt, dass aufgrund des eingebrachten Konstrukts die Anzahl und Größe der entstandenen Fragmente in diesem Locus verändert war. Die restringierte DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (TAE-Gel, 1% Agarose, 80 mA) und mit einer nach Southern (1975) modifizierten Methode auf eine Nylonmembran transferiert. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 - 30 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung langsam schwenkend inkubiert. Dies ermöglichte auch den Transfer großer DNA-Fragmente. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH äquilibriert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; GE Healthcare, München) erfolgte über Kapillarkräfte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus

einem Pufferreservoir durch das Gel hindurch in einen Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden dabei durch den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Transfer erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 5 h.

Zur Detektion der DNA-Fragmente wurden DNA-Sonden mit  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig) radioaktiv markiert. Als Sonden wurden die etwa 1 kb großen Rekombinationsflanken des jeweiligen Konstrukts verwendet. Um Integration in den *ip*-Locus nachzuweisen wurde ein 0,6 kb Fragment des *ip* Gens (*sdh2*) benutzt. Es wurden etwa 100 ng PCR-Produkt oder Restriktions-Fragment mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  auf ein Volumen von 33  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, 10 min bei 98°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Dieser Ansatz wurde mit 5  $\mu\text{l}$  10 x labeling buffer (NEB), 6  $\mu\text{l}$  dNTP Mix ohne dCTP (je 0,5 mM), 1  $\mu\text{l}$  Klenow-Fragment (NEB, Frankfurt) und 5  $\mu\text{l}$   $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (1,85 MBq) auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung von nicht inkorporierten radioaktiven dCTPs erfolgte über Amersham S300 Säulchen (2.800 Upm, 2 min; Heraeus Biofuge 15), die zuvor durch Zentrifugation (2.700 Upm, 1 min) äquilibriert wurden. Die markierte Sonde wurde in 10 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und 10 min bei 98°C denaturiert.

Die Membranen wurden in einem Hybridisierungssofen 10 min mit Southern-Hybridisierungspuffer prähybridisiert (65°C) und der Prähybridisierungspuffer anschließend durch die denaturierte Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht drehend im Hybridisierungssofen. Die Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweißt und Speicherleuchtstofffolien (*storage phosphor screens*; Molecular Dynamics) über Nacht exponiert. Diese wurden anschließend in einen Storm 840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) eingelesen. Die weitere Bearbeitung erfolgte über die Software Imagequant.

1 M Natriumphosphatpuffer	Lösung I	1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$
	Lösung II	1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$
	Lösung I und Lösung II in einem Verhältnis von etwa 4:1 mischen, pH 7,0	
Southern-Hybridisierungspuffer	7% (w/v) SDS in 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0	
Southern-Waschpuffer	1% (w/v) SDS in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0	

### 4.5.3.3 Quantitative „real-time“ PCR

Für Expressionsanalysen aus axenischer Kultur wurde die gewonnene Gesamt-RNA (siehe Kapitel 4.5.2.4) zunächst mittels First-Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Herstellerangaben revers transkribiert. Dabei wurde etwa 1 µg aufgereinigte Gesamt-RNA eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Der Reaktionsansatz wurde mittels Super Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl der verdünnten cDNA bzw. 0,5 µg der isolierten genomischen DNA (vgl. Kapitel 4.5.2.3) nach Herstellerangaben hergestellt. Als Referenzfarbstoff wurde 1 µl einer 1 µM Fluorescein-Lösung (Bio-Rad, München) je 50 µl PCR-Ansatz verwendet. Die quantitative PCR erfolgte auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des Programms 95°C/2 min - [95°C/30 s - 62°C/30 s - 72°C/30 s] x 45. Die Spezifität der Amplifikation wurde anhand einer Schmelzkurve am Bio-Rad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des CT (*threshold cycle*)-Wertes, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die Bio-Rad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Werte erfolgte mit dem Program Bio-Rad Gene Expression Macro.

Folgende Oligonukleotid-Paare wurden für die qPCR-Analysen eingesetzt: oDL140/oDL141 (*kpp6*) oPB94/oPB95 (*ppi*), mfa1RT-F/mfaRT-R (*mfa1*) und GAPDH-F/GAPDH-R (*GAPDH* aus Mais). Die *kpp6* Expression wurde relativ zur *ppi* (*um03726.2*) Expression dargestellt. Zur Bestimmung der pilzlichen Biomasse in infizierten Maispflanzen wurde das Verhältnis von Pilz-DNA (*mfa1*) zu Pflanzen-DNA (*GAPDH*) gebildet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Werte gemittelt.

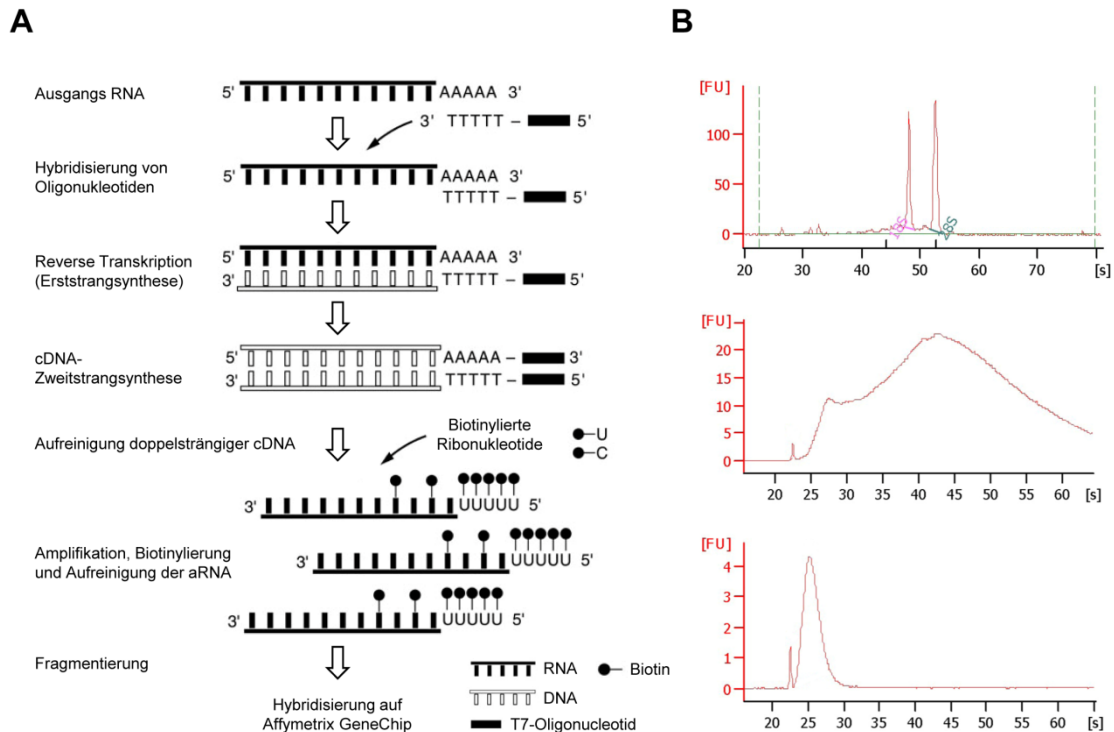
## 4.5.4 Transkriptomanalysen

Für die Transkriptomanalyse wurden die zu untersuchenden Stämme auf Parafilm oder auf Parafilm unter Zugabe von HPS für exakt 12 h inkubiert und anschließend die RNA aus adhäsiven Filamenten isoliert (siehe Kapitel 4.5.2.5). Es wurden je Bedingung und Stamm drei unabhängige Experimente durchgeführt.

### 4.5.4.1 Amplifikation der RNA

Die RNA-Proben wurden ggf. mittels speedvac (Univapo 100H; UniEquip, Planegg) ankonzentriert und 100 ng Gesamt-RNA für die Transkriptomanalyse eingesetzt. Es wurde

eine Ein-Schritt-Amplifikation mittels GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix, High Wycombe/UK) nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte ist in Abb. 36A dargestellt.



**Abb. 36: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung für die Transkriptomanalyse.** (A) Ausgehend von der isolierten Gesamt-RNA wurde eine reverse Transkription mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden durchgeführt. Nach Zweitstrang cDNA-Synthese folgte die *in vitro* Transkription unter gleichzeitiger Biotinmarkierung der aRNA. Vor Hybridisierung wurde die aRNA auf eine Größe von 100 - 150 bp fragmentiert. (B) Die Qualität der eingesetzten Gesamt-RNA (oben), der aRNA (mitte) sowie der fragmentierten aRNA (unten) wurde mittels Kapillargelelektrophorese auf einem 2100-Bioanalyzer (Agilent) bestimmt.

Die RNA wurde zunächst revers transkribiert und die entstandene Erststrang cDNA als Matrize für die Zweitstrangsynthese eingesetzt. Dann folgte die *in vitro* Transkription, die zu einer linearen Amplifizierung der RNA führt. Dabei wurde durch Verwendung von Biotin-konjugierten Ribonukleotiden die RNA mit Biotin markiert. Die Aufreinigung der aRNA (amplifizierte RNA) erfolgte durch *magnetic RNA binding beads* (GeneChip 3' IVT Express Kit; Affymetrix, High Wycombe/UK), einem *magnetic stand* (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) und einem 96-well Barnstead *orbital shaker* (Fisher Scientific, Schwerte) nach exakten Vorgaben des Protokolls (GeneChip 3' IVT Express Kit). Nach diesem Schritt wurde die Qualität der aRNA auf einem Agilent 2100-BioanalyzerR nach Herstellerangaben überprüft (Abb 36B). Es wurden 15 µg aRNA für die Fragmentierung eingesetzt, die nach Protokollangaben (GeneChip 3' IVT Express Kit) durchgeführt wurde.

Die Fragmentierung der aRNA wurde auf einem Agilent 2100-BioanalyzerR überprüft (Abb. 36B).

#### 4.5.4.2 Array-Hybridisierung

Durch Verwendung des GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kits (Affymetrix, High Wycombe/UK) wurde ein Hybridisierungscocktail nach Herstellerangaben angesetzt. Dabei wurden 15 µg fragmentierte aRNA eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte auf Affymetrix *Ustilago maydis* Custom GeneChips und wurde nach Protokollangaben durchgeführt (GeneChip 3' IVT Express Kit). Zum Verschließen der Chips wurden Tough Spots (Diversified Biotech, Dedham/USA) verwendet. Die Arrays wurden im Hybridisierungssofen (60 Upm) für exakt 16 h bei 45°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde der Chip entleert und mit 300 µl Waschpuffer A (Hybridization, Wash, and Stain Kit) befüllt. Alle weiteren Schritte, die die Bindung der biotinylierten aRNA an SAPE (*streptavidin phycoerythrin conjugate*) sowie Waschschrte beinhalteten, wurden durch eine GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) automatisch durchgeführt. Dafür wurde das FS450\_0004-Programm (Affymetrix Microarray Suite 5.9) ausgeführt. Nach Abschluß der Waschschrte wurden die Chips mittels GeneChip Scanner (Affymetrix) eingelesen.

#### 4.5.4.3 Datenanalyse

Zunächst wurden durch Verwendung des Programms Affymetrix Microarray Suite 5.9 die Expressionswerte kalkuliert. Für die vergleichende Transkriptomanalyse wurden, unter Berücksichtigung von drei biologischen Replikaten, die differentiell regulierten Gene mit Hilfe des Programmes dChip (Li und Hung Wong, 2001) identifiziert. Differentiell regulierte Gene wurden dabei als signifikant betrachtet, wenn sie mindestens eine zweifache Änderung ihrer Expression zeigten ( $B/E > 2$ ), die Differenz der absoluten Expressionswerte mehr als 20 betrug ( $E-B > 20$ ) und die Irrtumswahrscheinlichkeit bei einem p-Wert von  $< 0,05$  lag. Hierarchische Cluster-Analysen wurden ebenfalls mit dChip durchgeführt, wobei die jeweiligen Filterlisten manuell erstellt wurden



## 4.6 Biochemische Methoden

### 4.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten

#### 4.6.1.1 Gewinnung von denaturierten Proteinen aus *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde in Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und 10 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R). Das Zellpellet wurde einmal mit 50 mM Tris-HCl (pH 6,8) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in ESB-Puffer resuspendiert und für 3 min bei 95°C erhitzt (Eppendorf-Wärmeblock, 800 Upm). Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Proben für 3 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt, nochmals für 1 min auf 95°C erhitzt und die Proben anschließend abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min; Heraeus Biofuge 15). Für die SDS-PAGE wurden 5 - 15 µl des Überstandes eingesetzt.

ESB-Puffer	2% (w/v) SDS
	10% (v/v) Glycerin
	0,01% (w/v) Bromphenolblau
	50 mM (w/v) Dithiothreitol (kurz vor Verwendung)
	in 80 mM Tris-HCl, pH 6,8

#### 4.6.1.2 Gewinnung von denaturierten Proteinen aus *U. maydis*

In der Regel wurden Zellen in YEPSL bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen und 10 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R). Das Zellpellet wurde einmal mit 100 mM Tris-HCl (pH 6,8) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Thorner-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 95°C erhitzt (Eppendorf-Wärmeblock, 800 Upm). Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Proben für 5 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt. Nach erneutem Erhitzen (5 min, 95°C, 800 Upm) wurden die Proben abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min; Heraeus Biofuge 15) und 5 - 15 µl des Überstandes für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt.

Thorner-Puffer	8 M Urea,
	5% (w/v) SDS
	0.1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA
	0.01% (w/v) Bromphenolblau,
	50 mM Dithiothreitol (kurz vor Verwendung)
	in 100 mM Tris-HCl, pH 6,8



Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R) und zweimal mit PBS (*phosphate-buffered saline*; pH 7,4) gewaschen. Es wurde eine *crosslinking* Reaktion durchgeführt. Dafür wurde die Zellsuspension mit DSP (Dithiobis-Succinimidyl-Propionat; Fisher Scientific, Schwerte; Endkonzentration 20 mM) versetzt und 45 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tris-HCl (pH 7,5; Endkonzentration 20 mM) und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml IP-Lysepuffer mit Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde in einem FastPrep-24 Homogenisator mittels lysing matrix B (5,0 m/s, 3 x 20 s; MP Biomedicals, Heidelberg) durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden daraufhin abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C; Heraeus Biofuge 15) und ein Teil des Überstandes mit Thorner-Puffer gemischt (Einsatz).

PBS (pH 7,4)	8 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 137 mM NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
IP-Lysepuffer	150 mM NaCl 1% (v/v) Nonidet P40 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
IP-Waschpuffer I	500 mM NaCl 0,1% (v/w) Nonidet P40 0,05% (w/v) Na-Deoxycholat in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
IP-Waschpuffer II	0,1% (v/v) Nonidet P40 0,05% (w/v) Na-Deoxycholat in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

Zu 1 ml Überstand wurden 5 µg anti-Myc Antikörper aus Kaninchen (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gegeben und die Proben 1 h bei 4°C auf einem Roll-Inkubator (Kisker, Steinfurt) bei 10 Upm inkubiert. Danach wurden 50 µl Protein G Agarose (Roche, Mannheim) zugegeben und die Proben über Nacht drehend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Agarosebeads pelletiert (10.000 Upm, 20 s, 4°C; Heraeus Biofuge 15) und einmal mit IP-Lysepuffer gewaschen. Daraufhin wurden die Agarosebeads in IP-Waschpuffer I aufgenommen und abzentrifugiert (10.000 Upm, 20 s, 4°C; Heraeus Biofuge 15). Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden

die Agarosebeads in IP-Waschpuffer II resuspendiert, erneut zentrifugiert (10.000 Upm, 20 s, 4°C; Heraeus Biofuge 15) und in Thorner-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und dann in einem Eppendorf-Wärmeblock 3 min erhitzt (95°C). In Relation zu den aufgetragenen immunpräzipitierten Proben wurde für eine SDS-PAGE 5% Einsatz geladen.

### 4.6.3 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

#### 4.6.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) angewandt. Bei dieser Methode wird den Proteinen durch Bindung an SDS eine konstant negative Ladung verliehen, was die Auftrennung in einem elektrischen Feld erlaubt. Es wurden Gelkammern (Mini Protean System; Bio-Rad, München) mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Gele setzten sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine in einer Ebene vor dem Eintritt in das Trenngel. Im Trenngel werden die Proteine durch ein Polyacrylamidnetz nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein gefärbtes Proteinstandardgemisch (15 - 170 kD; Prestained Page Ruler; Fermentas, St. Leon-Roth) abgeschätzt. Die Auftrennung erfolgte bei 50 mA/Gel.

SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS in 25 mM Tris-HCl, pH 8,3
Sammelgel	5% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) TEMED
Trenngel	8 - 10% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) TEMED

#### 4.6.3.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-dry Transfer System (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, München) übertragen. Die Membran wurde vor der Verwendung durch kurzes Benetzen mit Methanol aktiviert. Es wurde eine Lage 3 mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der PVDF-Membran bedeckt. Auf die Membran wurde blasenfrei das SDS-Gel gelegt und mit einem weiteren feuchten 3 mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte für 1 - 2 h bei 80 mA/Gel.

Western-Transfer-Puffer	192 mM Glycin 15% (v/v) Methanol in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4
-------------------------	---

Die auf die PVDF-Membran überführten Proteine wurden immunologisch detektiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Membran wurde mit Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert, kurz mit TBS-T gewaschen und dann bei 4°C mit Antikörperlösung, die den primären Antikörper enthielt, über Nacht geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Antikörperlösung, welche den sekundären Antikörper enthielt, für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Für die Western-Analysen wurden HRP (*horse raddish peroxidase*)-konjugierte sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt, indem die Membran mit ECL-Reagenz (GE Healthcare, München) oder SuperSignal West Femto (Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben inkubiert wurde. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 30 s bis 30 min. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

TBS-T	150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween20 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
Blockierlösung	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
Antikörperlösung	Antikörper verdünnt in 3% (w/v) Milchpulver in TBS-T

**Tab. 7: Verwendete Antikörper**

Antikörper	Wirt	Verwendung <sup>1</sup>	Bezug <sup>2</sup>
anti-HA	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von HA-Fusionsproteinen in Western-Analysen und Kolonie-Sekretionstests (1:10000), zudem für Immunfluoreszenz verwendet (1:1500)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen) #H9658
anti-GFP	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von GFP-Fusionsproteinen in Western-Analysen (1:1000)	Roche (Mannheim) #11814460001
anti-c-Myc	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Myc-Fusionsproteinen in Western-Analysen (1:3000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen) #M5546
anti-c-Myc	Hase	Verwendet für die Immunpräzipitation des Myc-Kpp6 Fusionsproteins	Sigma-Aldrich (Deisenhofen) #C3956
anti-Gal4-AD	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Gal4-AD-Fusionsproteinen in Western-Analysen (1:3000)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) #sc1663
anti-Gal4-BD	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Gal4-BD-Fusionsproteinen in Western-Analysen (1:3000)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) #sc510
anti-Actin	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Actin in Western-Analysen (1:3000)	Calbiochem/Merck (Darmstadt) #CP01
anti-Tubulin	Maus	Primärer Antikörper zur Detektion von Tubulin in Western-Analysen (1:3000)	Calbiochem/Merck (Darmstadt) #CP06
anti-Maus-HRP	Pferd	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Mäusen gewonnen wurden, verwendet in Western-Analysen (1:10000)	Cell Signaling Technology(Danver/USA) #7076
anti-Hase-HRP	Ziege	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Hasen gewonnen wurden, verwendet in Western-Analysen (1:10000)	Cell Signaling Technology(Danver/USA) #7074
anti-Maus-AF-488	Ziege	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Mäusen gewonnen wurden, verwendet für Immunfluoreszenz (1:1500)	Invitrogen (Karlsruhe) #A11017
anti-RFP-Serum	Hase	Dieses Serum wurde in Western-Analysen zur Detektion von mCherry eingesetzt (1:10000)	M. Thanbichler, pers. Mitteilung

<sup>1</sup> Die jeweils verwendete Verdünnung des Antikörpers ist in Klammern angegeben

<sup>2</sup> Die jeweilige Produktnummer ist angegeben

#### 4.6.3.3 Kolonie-Sekretionstest

Für diesen Test wurden Nitrocellulosemembranen (GE Healthcare, München) auf PD-Festmedium plaziert. Es wurden *U. maydis* Kulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert und in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt. Von diesen Zellsuspensionen wurden 5 µl auf die Membranen getropft und die Platte für 16 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien unter fließendem Wasser und mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner Bio-one, Frickenhausen) entfernt. Die von der Kolonie auf die Membran sekretierten Proteine wurden wie in Kapitel 4.6.3.2 beschrieben detektiert.

## 4.7 Färbungen und Mikroskopie

### 4.7.1 Färbemethoden

#### 4.7.1.1 Calcofluor-Färbung

Um die Zellwand von *U. maydis* sichtbar zu machen wurde Calcofluor white (CW; Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Dafür wurden Zellsuspensionen auf einen Objektträger aufgebracht (siehe Kapitel 4.7.1.3) und mit Calcofluor-Färbelösung in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Zur Färbung von adhäsiven Filamenten wurden 5 µl Färbelösung auf die zu mikroskopierende Oberfläche gegeben. Um Hyphen und Appressorien von *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche sichtbar zu machen, wurden Blattproben 18 h bzw. 3 Tage nach Infektion geerntet. Dazu wurde das 3. Blatt präpariert und ein 2 cm langes Stück unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten. Das Blattfragment wurde für etwa 30 s in Calcofluor-Färbelösung gegeben und kurz mit Wasser gewaschen. Danach wurde die Mittellamelle herausgetrennt und das Präparat mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt.

Calcofluor-Stammlösung	10 mg/ml Fluorescent Brightener 28 in DMSO; Lagerung dunkel bei -20°C
------------------------	--

Calcofluor-Färbelösung:	1:100 Verdünnung der Stammlösung in 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; Lagerung dunkel bei 4°C
-------------------------	--

#### 4.7.1.2 Färbung mit WGA-Alexafluor 488 und Propidium-Iodid

Propidium Iodid (PI) färbt Pflanzenzellwände und besitzt durch seine interkalierenden Eigenschaften auch Affinität zu DNA. Da PI nicht membrangängig ist können nur Zellkerne von abgestorbenen Zellen gefärbt werden (Kroesen *et al.*, 1992). Für die Färbung von Blattepidermiszellen mit PI (Invitrogen, Karlsruhe) wurden Blattproben geerntet (siehe Kapitel 4.7.1.1) und diese 30 s in PI-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Blätter mit Wasser gewaschen und wie in Kapitel 4.7.1.1 beschrieben für die Mikroskopie vorbereitet.

WGA-AF488 (Molecular Probes, Karlsruhe) diente der Visualisierung von *U. maydis* Hyphen in infiziertem Pflanzengewebe. Die Pflanzenzellwände wurden mit PI gegengefärbt. 6 Tage nach Infektion wurden infizierte Blattproben geerntet und für mindestens zwei Tage in Ethanol entfärbt. Dann wurden sie für 4 h in 10% KOH bei 85°C

inkubiert und die Proben anschließend mehrfach mit PBS gewaschen. Die Inkubation in der WGA-AF488/PI-Färbelösung erfolgt für 30 min; währenddessen wurden die Blätter 3 x 5 min bei 100 mbar vakuuminfiltriert (CVC 3000; Vacuubrand, Wertheim). Nach erfolgter Färbung wurden die Proben in PBS entfärbt und dunkel bei 4°C bis zur Analyse durch konfokale Mikroskopie gelagert.

PI-Stammlösung	10 mg/ml Propidium Iodid in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ; Lagerung dunkel bei 4°C
WGA-AF488 Stammlösung	1 mg/ml WGA-Alexafluor 488 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ; Lagerung dunkel bei 4°C
WGA-AF488/PI-Färbelösung	20 µg/ml Propidium Iodid 10 µg/ml WGA-Alexafluor 488 0,02% Tween20 in PBS, pH 7,4

#### 4.7.1.3 Vorbereitung von Zellen aus axenischer Kultur für die Mikroskopie

Für die Mikroskopie von Zellen aus axenischer Kultur wurden Kulturen verwendet, die bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,8 gewachsen waren. Vor der Mikroskopie wurden die Objektträger mit einem Agarosekissen (2% Agarose) versehen, auf das anschließend die Zellsuspension aufgetragen wurde. Dies führte dazu, dass die Zellen in ihrer Position fixiert wurden, was die Mikroskopie erleichterte. Für die Inhibition der Endocytose wurde Latrunculin A (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Eine 20 mM Latrunculin A Stammlösung (in DMSO) wurde mit der Kultur 1:2000 verdünnt. Als Kontrolle wurden Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Diese Kulturen wurden für 2 h auf einem Roll-Inkubator (Kisker, Steinfurt) bei Raumtemperatur gedreht (20 Upm) bevor sie mikroskopisch analysiert wurden.

#### 4.7.2 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie von *U. maydis* wurde zunächst die Bildung von adhäsiven Filamenten und Appressorien wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben induziert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Objektträger für 15 min in 1% Formaldehyd (in PBS, pH 7,4) gelegt. Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer wurden die Objektträger in Blockierlösung (5% BSA in PBS, pH 7,4) überführt und für 1 h schwenkend inkubiert. Die Blockierlösung wurde durch Antikörperlösung ersetzt. Diese enthielt primäre anti-HA



Antikörper aus Maus (Sigma-Aldrich; Deisenhofen) in einer 1:1500 Verdünnung in Blockierlösung. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurden die Objektträger dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit Antikörperlösung, welche den sekundären AF488-konjugierten Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe) in einer Verdünnung von 1:1500 (in Blockierlösung) enthielt, für 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurden die Filamente durch konfokale Mikroskopie analysiert.

### 4.7.3 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die Mikroskopie wurde ein Axioplan II microscope (Zeiss) mit differentieller Interferenz Optik verwendet. Für DIC (*differential interference contrast*)-Mikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie wurden ein 40-, 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (Zeiss) mit 1,4 numerischer Aperatur verwendet. GFP wurde mit GFP-Filtern (ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP), mCherry mit TexasRed-Filtern (HC562/40BP, HC593LP, HC624/40BP) und Calcofluor mit DAPI-Filtern (HC375/11BP, HC409BS, HC447/60BP) detektiert. Die Filtersets wurden von Semrock (New York/USA) bezogen. Digitale Aufnahmen wurden mit einer HQ charge-couple device camera (Photometrics, Göttingen) durchgeführt und die Aufnahmen mit dem Programm MetaMorph (Version 6.2r6) bearbeitet.

**Tab. 8: Verwendete Laser und detektierte Emissionswellenlängen bei konfokaler Mikroskopie**

Laser	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Detektion
Argon Laser	488	495 - 530 nm	GFP
Argon Laser	488	500 - 540 nm	AF488
DPSS Laser	561	580 - 660 nm	mCherry, PI
405 Diode	405	415 - 460 nm	CW, Autofluoreszenz

Für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde ein TCS-SP5 (Leica, Bensheim) verwendet. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die verwendeten Laser für die verschiedenen Anwendungen sind in der Tabelle 8 dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der zugehörigen LEICA Software LAS AF (Leica application suite). Dabei wurden die zweidimensional abgerasterten Ebenen in einer Maximumprojektion übereinander gelegt.

## 4.8 Bioinformatische Methoden

Aminosäure- und Nukleotidsequenzen wurden aus den Datenbanken *S. cerevisiae* Genome Database (<http://yeastgenome.org/>) und MIPS *Ustilago maydis* Database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) entnommen. Die von diesen Webseiten zur Verfügung gestellten BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990, 1997)-Funktionen wurden zur Identifizierung von ähnlichen Protein- und Nukleotidsequenzen verwendet. Die virtuelle Klonierung von Plasmiden und die virtuelle Erstellung von Oligonukleotidsequenzen wurden mit dem Programm VectorNTI 10.0 (Invitrogen) durchgeführt. Dieses Programm enthält zudem eine ClustalW Funktion (Thompson *et al.*, 1994). Damit wurden Aminosäuresequenzen gegeneinander abgeglichen und die jeweilige Aminosäureidentität bestimmt. Ein Sequenzabgleich von Nukleotidsequenzen erfolgte ebenfalls mit VectorNTI. Die Domänenanalyse von Proteinsequenzen wurde mit den Programmen MyHits (Pagni *et al.*, 2004; <http://myhits.isb-sib.ch/>), SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; Schultz *et al.*, 1998; <http://smart.embl-heidelberg.de/>) und DAS (Cserzo *et al.*, 1997; <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) durchgeführt. Die Klassifizierung von Proteinen in funktionelle Kategorien erfolgte mittels FunCat (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>). Zur Vorhersage von Signalpeptiden in Proteinsequenzen diente das Programm SignalP 3.0 (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004; <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Zur Vorhersage von putativen O-Glycosylierungsstellen in Aminosäuresequenzen wurde das Programm NetOGlyc (Julenius *et al.*, 2005; <http://cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) und zur Vorhersage von putativen N-Glycosylierungsstellen das Programm NetNGlyc (Blom *et al.*, 2004; <http://cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) verwendet. Da Programm KinasePhos (Huang *et al.*, 2005; <http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>) wurde zur Vorhersage von putativen MAP-Kinase Phosphorylierungsstellen in Proteinsequenzen benutzt.

## 5 Literatur

- Ahn, N., Kim, S., Choi, W., Im, K.H., and Lee, Y.H. (2004). Extracellular matrix protein gene, EMP1, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Cells* **17**, 166-173.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W., and Kahmann, R. (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol Genet Genomics* **270**, 303-314.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Andrews, D.L., Egan, J.D., Mayorga, M.E., and Gold, S.E. (2000). The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 781-786.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kongston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. (USA: John Wiley & Sons, Inc.).
- Bae, C.Y., Kim, S., Choi, W.B., and Lee, Y.H. (2007). Involvement of extracellular matrix and integrin-like proteins on conidial adhesion and appressorium differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 1198-1203.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1994a). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology* **18**, 247-266.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1994b). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Basse, C.W., Stumpferl, S., and Kahmann, R. (2000). Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol* **20**, 329-339.
- Basse, C.W., Kolb, S., and Kahmann, R. (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **43**, 75-93.
- Bechinger, C., Giebel, K.F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H.B., and Bastmeyer, M. (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-1899.

- Becht, P., König, J., and Feldbrugge, M.** (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**, 4964-4973.
- Beckerman, J.L., and Ebbole, D.J.** (1996). MPG1, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 450-456.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S.** (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.
- Bershadsky, A., Kozlov, M., and Geiger, B.** (2006). Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 472-481.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S.** (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633-1649.
- Blomberg, A., and Adler, L.** (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* **33**, 145-212.
- Boguslawski, G.** (1992). PBS2, a yeast gene encoding a putative protein kinase, interacts with the RAS2 pathway and affects osmotic sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **138**, 2425-2432.
- Boisnard, S., Ruprich-Robert, G., Florent, M., Da Silva, B., Chapeland-Leclerc, F., and Papon, N.** (2008). Role of Sho1p adaptor in the pseudohyphal development, drugs sensitivity, osmotolerance and oxidant stress adaptation in the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Yeast* **25**, 849-859.
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R.** (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmle, C., and Kahmann, R.** (1995). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- Borges-Walmsley, M.I., and Walmsley, A.R.** (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* **8**, 133-141.
- Bottin, A., Kämper, J., and Kahmann, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- Bowman, D.H.** (1946). Sporidial fusion in *Ustilago maydis*. *J Agric Res* **72**, 233-243.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München, München.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., and Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P., and Kahmann, R.** (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 2199-2210.

- Brachmann, A., König, J., Julius, C., and Feldbrügge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- Braun, E.J., and Howard, R.J.** (1994). Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. *Protoplasma* **181**, 202-212.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., and Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-445.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., and Gustin, M.C.** (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-1763.
- Broomfield, P.L., and Hargreaves, J.A.** (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **22**, 117-121.
- Carpita, N.C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D.A., Catchpole, G., Wilson, R.H., and McCann, M.C.** (2001). Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol* **127**, 551-565.
- Chen, R.E., and Thorner, J.** (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1311-1340.
- Choi, W., and Dean, R.A.** (1997). The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell* **9**, 1973-1983.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Commenil, P., Belingheri, L., and Dehorter, B.** (1998). Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol* **52**, 1-14.
- Cook, J.G., Bardwell, L., and Thorner, J.** (1997). Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**, 85-88.
- Correa, A., Staples, R.C., and Hoch, H.C.** (1996). Inhibition of thigmostimulated cell differentiation with RGD-peptides in *Uromyces* germlings. *Protoplasma* **194**, 91-102.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A.** (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**, 673-676.
- Cullen, P.J.** (2007). Signaling mucins: the new kids on the MAPK block. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **17**, 241-257.
- Cullen, P.J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B.J., Jigami, Y., and Sprague, G.F., Jr.** (2000). Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**, 1005-1018.

- Cullen, P.J., Sabbagh, W., Jr., Graham, E., Irick, M.M., van Olden, E.K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L., and Sprague, G.F., Jr. (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**, 1695-1708.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Day, P.R., and Anagnostakis, S.L. (1973). The killer system in *Ustilago maydis*: Heterokaryon transfer and loss of determinants. *Phytopathology* **63**, 1017-1018.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 344-345.
- Deising, H.B., Werner, S., and Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect* **2**, 1631-1641.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B., and Sweigard, J.A. (1999). *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* **11**, 2013-2030.
- Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F.I., Meglecz, E., and Roncero, M.I. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol* **39**, 1140-1152.
- Di Stasio, M., Brefort, T., Mendoza-Mendoza, A., Münch, K., and Kahmann, R. (2009). The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **73**, 73-88.
- Dixon, K.P., Xu, J.R., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (1999). Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **11**, 2045-2058.
- Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M. (2006). Different signalling pathways involving a Galpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol Microbiol* **59**, 821-835.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R.P., Kämper, J., and Kahmann, R. (2008a). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**, 29-40.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., and Kahmann, R. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kuhnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., and Kämper, J. (2008b). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, 181-195.
- Doi, R.H., and Kosugi, A. (2004). Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat Rev Microbiol* **2**, 541-551.
- Drogen, F., O'Rourke, S.M., Stucke, V.M., Jaquenoud, M., Neiman, A.M., and Peter, M. (2000). Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol* **10**, 630-639.

- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J.J., and Dufrene, Y.F. (2009). The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat Chem Biol* **5**, 857-862.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14863-14868.
- Emmett, R.W., and Parbery, D.G. (1975). Appressoria. *Annu Rev Phytopathol* **13**, 147-167.
- Epstein, L., and Nicholson, R.N. (1997). Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. In *The Mycota V, Plant Relationships*, ed. Carroll G.C., Tudzynski P., Springer Verlag, Berlin, 11-25.
- Epstein, L., Laccetti, L.B., Staples, R.C., and Hoch, H.C. (1987). Cell-substratum adhesive protein involved in surface contact responses of the bean rust fungus. *Physiol Mol Plant Pathol* **30**, 373-388.
- Epstein, L., Laccetti, L., Staples, R.C., Hoch, H.C., and Hoose, W.A. (1985). Extracellular proteins associated with induction of differentiation in bean rust uredospore germlings. *Phytopathology* **75**, 1073-1076.
- Fernandez-Alvarez, A., Elias-Villalobos, A., and Ibeas, J.I. (2009). The O-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **21**, 3397-3412.
- Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**, 623-633.
- Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J., and Perez-Martin, J. (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.
- Frank, A.B. (1883). Über einige neue und weniger bekannte Pflanzenkrankheiten. *Ber Deutsch Bot Gesell* **1**, 29-34.
- Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I., and Steinberg, G. (2006). Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2066-2081.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., and Perez-Martin, J. (2003). Pheromone-Induced G(2) Arrest in the Phytopathogenic Fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- Gebbink, M.F., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L., and Wösten, H.A. (2005). Amyloids--a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **3**, 333-341.
- Giesbert, S., Lepping, H.B., Tenberge, K.B., and Tudzynski, P. (1998). The Xylanolytic System of *Claviceps purpurea*: Cytological Evidence for Secretion of Xylanases in Infected Rye Tissue and Molecular Characterization of Two Xylanase Genes. *Phytopathology* **88**, 1020-1030.
- Gilbert, R.D., Johnson, A.M., and Dean, R.A. (1996). Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**, 335-346.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M., and Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.

- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Hao, N., Behar, M., Parnell, S.C., Torres, M.P., Borchers, C.H., Elston, T.C., and Dohlman, H.G.** (2007). A systems-biology analysis of feedback inhibition in the Sho1 osmotic-stress-response pathway. *Curr Biol* **17**, 659-667.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R., and Bölker, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- Hatrup, C.L., and Gendler, S.J.** (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol* **70**, 431-457.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., and Kämper, J.** (2010). The transcription factor Rbfl is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**, e1001035.
- Hoch, H.C., Staples, R.C., Whitehead, B., Comeau, J., and Wolf, E.D.** (1987). Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *uromyces*. *Science* **235**, 1659-1662.
- Hoffman, C.S., and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Hohmann, S.** (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-372.
- Holliday, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**, 204-230.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*, ed. King, R.C., Plenum Publishing Corporation, New York **1**, 575-595.
- Howard, R.J.** (1997). Breaching the outer barriers – cuticle and cell wall penetration. In *The Mycota V, Plant Relationships*, ed. Carroll G.C., Tudzynski P., Springer Verlag, Berlin, 43-60.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H., and Money, N.P.** (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11281-11284.
- Huang, H.D., Lee, T.Y., Tzeng, S.W., and Horng, J.T.** (2005). KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res* **33**, W226-229.
- Huser, A., Takahara, H., Schmalenbach, W., and O'Connell, R.** (2009). Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 143-156.
- Jentoft, N.** (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**, 291-294.



- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., and Brunak, S.** (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153-164.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., and Feldbrügge, M.** (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 5817-5826.
- Kahmann, R., and Kämper, J.** (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytol* **164**, 31-42.
- Kamakura, T., Yamaguchi, S., Saitoh, K., Teraoka, T., and Yamaguchi, I.** (2002). A novel gene, CBP1, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic surface sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 437-444.
- Kämper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., and Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B.W.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kars, I., Krooshof, G.H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J.A., and van Kan, J.A.** (2005). Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J* **43**, 213-225.
- Keyse, S.M.** (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 186-192.
- Kim, S., Ahn, I.P., Rho, H.S., and Lee, Y.H.** (2005). MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Mol Microbiol* **57**, 1224-1237.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S.** (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 239-256.

- Krantz, M., Becit, E., and Hohmann, S. (2006). Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet* **49**, 137-151.
- Kroesen, B.J., Mesander, G., ter Haar, J.G., The, T.H., and de Leij, L. (1992). Direct visualisation and quantification of cellular cytotoxicity using two colour fluorescence. *J Immunol Methods* **156**, 47-54.
- Kron, S.J., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**, 1003-1022.
- Kubo, Y., and Furusawa, I. (1991). Melanin biosynthesis. Prerequisite for successful invasion of the host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, ed. Cole G.T., Hoch H.C., Plenum Publishing Corporation, New York, 205-218.
- Kulkarni, R.D., Thon, M.R., Pan, H., and Dean, R.A. (2005). Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biol* **6**, R24.
- Kumamoto, C.A. (2008). Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nat Rev Microbiol* **6**, 667-673.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanver, D., Mendoza-Mendoza, A., Brachmann, A., and Kahmann, R. (2010). Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22**, 2085-2101.
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Segall, J.E., and Thomas, D.Y. (1997). Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J* **16**, 83-97.
- Lee, N., and Kronstad, J.W. (2002). ras2 Controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **1**, 954-966.
- Lee, Y.H., and Dean, R.A. (1993). cAMP Regulates Infection Structure Formation in the Plant Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 693-700.
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H., and Horwitz, B.A. (1999). A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13542-13547.
- Levitin, F., Stern, O., Weiss, M., Gil-Henn, C., Ziv, R., Prokocimer, Z., Smorodinsky, N.I., Rubinstein, D.B., and Wreschner, D.H. (2005). The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem* **280**, 33374-33386.
- Li, C., and Hung Wong, W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**, R32.
- Li, S.S. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* **390**, 641-653.

- Ligtenberg, M.J., Kruijsaar, L., Buijs, F., van Meijer, M., Litvinov, S.V., and Hilkens, J.** (1992). Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem* **267**, 6171-6177.
- Lillehoj, E.P., Kim, H., Chun, E.Y., and Kim, K.C.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* stimulates phosphorylation of the airway epithelial membrane glycoprotein Muc1 and activates MAP kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L809-815.
- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741-1744.
- Liu, S., and Dean, R.A.** (1997). G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 1075-1086.
- Liu, W., Zhou, X., Li, G., Li, L., Kong, L., Wang, C., Zhang, H., and Xu, J.R.** (2011). Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. *PLoS Pathog* **7**, e1001261.
- Lodder, A.L., Lee, T.K., and Ballester, R.** (1999). Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 1487-1499.
- Ma, Y., Qiao, J., Liu, W., Wan, Z., Wang, X., Calderone, R., and Li, R.** (2008). The shol1 sensor regulates growth, morphology, and oxidant adaptation in *Aspergillus fumigatus* but is not essential for development of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **76**, 1695-1701.
- Macao, B., Johansson, D.G., Hansson, G.C., and Hard, T.** (2006). Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 71-76.
- Madhani, H.D., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1997). MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**, 673-684.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H.** (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**, 554-558.
- Mahlert, M.** (2006). Charakterisierung kleiner G-Proteine der Ras- und Rho/Rac-Familie in *Ustilago maydis*: Zentrale Schalter in komplexen Netzwerken und ihr Einfluss auf die Organisation der Zellmorphologie. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B., and Bölker, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-578.
- Martinez-Espinoza, A.D., Garcia-Pedrajas, M.D., and Gold, S.E.** (2002). The *Ustilaginales* as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- Mayorga, M.E., and Gold, S.E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol* **34**, 485-497.
- Meerzaman, D., Shapiro, P.S., and Kim, K.C.** (2001). Involvement of the MAP kinase ERK2 in MUC1 mucin signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L86-91.

- Mendgen, K., and Deising, H.** (1993). Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytol* **124**, 193-213.
- Mendoza-Mendoza, A., Eskova, A., Weise, C., Czajkowski, R., and Kahmann, R.** (2009a). Hap2 regulates the pheromone response transcription factor prf1 in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kämper, J., and Kahmann, R.** (2009b). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**, 895-911.
- Mey, G., Held, K., Scheffer, J., Tenberge, K.B., and Tudzynski, P.** (2002). CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Mol Microbiol* **46**, 305-318.
- Mims, C.W., and Richardson, E.A.** (1989). Ultrastructure of appressorium development by basidiospore germlings of the rust fungus *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Protoplasma* **148**, 111-119.
- Mitchell, T.K., and Dean, R.A.** (1995). The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **7**, 1869-1878.
- Mösch, H.U., Roberts, R.L., and Fink, G.R.** (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5352-5356.
- Müller, O., Schreier, P.H., and Uhrig, J.F.** (2008). Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **279**, 27-39.
- Müller, P.** (2003). Signalweiterleitung in *Ustilago maydis*: Die Kpp4/Fuz7/Kpp2-MAPK-Kaskade kontrolliert Pheromonantwort und pathogene Entwicklung. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M., and Kahmann, R.** (1999). The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- Müller, P., Katzenberger, J.D., Loubradou, G., and Kahmann, R.** (2003a). Guanyl nucleotide exchange factor Sql2 and Ras2 regulate filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 609-617.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M., and Kahmann, R.** (2003b). Mating and pathogenic development of the smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* **2**, 1187-1199.
- Nelson, B., Parsons, A.B., Evangelista, M., Schaefer, K., Kennedy, K., Ritchie, S., Petryshen, T.L., and Boone, C.** (2004). Fus1p interacts with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis signaling pathways to control cell fusion during yeast mating. *Genetics* **166**, 67-77.

- Nicholson, R.L., and Epstein, L.** (1991). Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, ed. Cole G.T., Hoch H.C., Plenum Publishing Corporation, New York, 3-23.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Norice, C.T., Smith, F.J., Jr., Solis, N., Filler, S.G., and Mitchell, A.P.** (2007). Requirement for *Candida albicans* Sun41 in biofilm formation and virulence. *Eukaryot Cell* **6**, 2046-2055.
- Oh, Y., Donofrio, N., Pan, H., Coughlan, S., Brown, D.E., Meng, S., Mitchell, T., and Dean, R.A.** (2008). Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biol* **9**, R85.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I.** (2002). A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol* **22**, 4739-4749.
- Ospina-Giraldo, M.D., Mullins, E., and Kang, S.** (2003). Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Curr Genet* **44**, 49-57.
- Pagni, M., Ioannidis, V., Cerutti, L., Zahn-Zabal, M., Jongeneel, C.V., and Falquet, L.** (2004). MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res* **32**, W332-335.
- Pain, N.A., Green, J.R., Jones, G.L., and O'Connell, R.J.** (1996). Composition and organisation of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma* **190**, 119-130.
- Pandey, P., Kharbanda, S., and Kufe, D.** (1995). Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res* **55**, 4000-4003.
- Perez-Nadales, E., and Di Pietro, A.** (2011). The Membrane Mucin Msb2 Regulates Invasive Growth and Plant Infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* (in press).
- Peter, M., Neiman, A.M., Park, H.O., van Lohuizen, M., and Herskowitz, I.** (1996). Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J* **15**, 7046-7059.
- Pitoniak, A., Birkaya, B., Dionne, H.M., Vadaie, N., and Cullen, P.J.** (2009). The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response. *Mol Biol Cell* **20**, 3101-3114.
- Posas, F., and Saito, H.** (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**, 1702-1705.
- Pothiratana, C.** (2007). Functional characterization of the homeodomain transcription factor Hdp1 in *Ustilago maydis*. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.

- Powell, A.L., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B., and Labavitch, J.M.** (2000). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 942-950.
- Puhalla, J.E.** (1968). Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* **60**, 461-474.
- Rahn, J.J., Shen, Q., Mah, B.K., and Hugh, J.C.** (2004). MUC1 initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem* **279**, 29386-29390.
- Raitt, D.C., Posas, F., and Saito, H.** (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J* **19**, 4623-4631.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M., and Kahmann, R.** (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *EMBO J* **16**, 1934-1942.
- Reiser, V., Salah, S.M., and Ammerer, G.** (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**, 620-627.
- Roberts, R.L., and Fink, G.R.** (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**, 2974-2985.
- Rogers, L.M., Kim, Y.K., Guo, W., Gonzalez-Candelas, L., Li, D., and Kolattukudy, P.E.** (2000). Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9813-9818.
- Roman, E., Nombela, C., and Pla, J.** (2005). The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **25**, 10611-10627.
- Roman, E., Cottier, F., Ernst, J.F., and Pla, J.** (2009). Msb2 signaling mucin controls activation of Cek1 mitogen-activated protein kinase in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **8**, 1235-1249.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R., and Kämper, J.** (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- Rowell, J.B.** (1955). Functional role of compatibility factors and an in vitro test for sexual incompatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. *Phytopathology* **45**, 370-374.
- Rowell, J.B., and DeVay, J.E.** (1954). Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**, 356-362.
- Ruiz-Roldan, M.C., Maier, F.J., and Schafer, W.** (2001). PTK1, a mitogen-activated-protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 116-125.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

- Schauwecker, F., Wanner, G., and Kahmann, R.** (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 617-625.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V., and Kämper, J.** (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.
- Schirawski, J., Bohnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., and Kahmann, R.** (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- Schroeder, J.A., Thompson, M.C., Gardner, M.M., and Gendler, S.J.** (2001). Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* **276**, 13057-13064.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C.P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5857-5864.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Seet, B.T., and Pawson, T.** (2004). MAPK signaling: Sho business. *Curr Biol* **14**, R708-710.
- Sgarlata, C., and Perez-Martin, J.** (2005). The *cdc25* phosphatase is essential for the G2/M phase transition in the basidiomycete yeast *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **58**, 1482-1496.
- Singh, P.K., and Hollingsworth, M.A.** (2006). Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* **16**, 467-476.
- Skamnioti, P., and Gurr, S.J.** (2007). *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell* **19**, 2674-2689.
- Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Gold, S.E., and Perlin, M.H.** (2003). Isolation and characterization from pathogenic fungi of genes encoding ammonium permeases and their roles in dimorphism. *Mol Microbiol* **50**, 259-275.
- Snetselaar, K.M.** (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp Mycol* **17**, 345-355.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W.** (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., and Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol* **20**, 299-312.

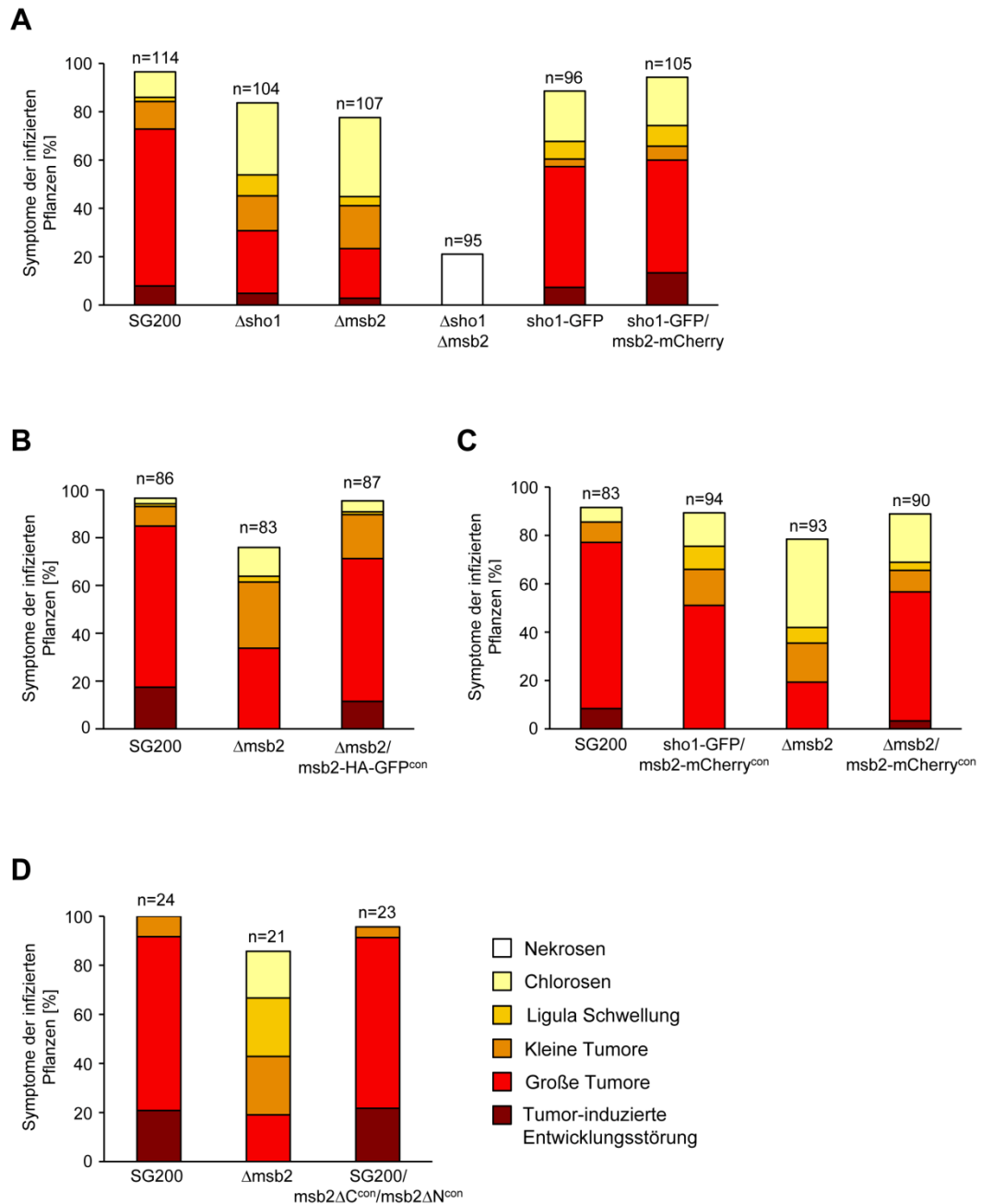
- Soto, P., Zhang, J., and Carraway, K.L.** (2006). Enzymatic cleavage as a processing step in the maturation of Muc4/sialomucin complex. *J Cell Biochem* **97**, 1267-1274.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bottin, A., and Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., and Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S.** (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5187-5192.
- Staples, R.C.** (1985). The development of infection structures by the rusts and other fungi. *Microbiol Sci* **2**, 193-194, 197-198.
- Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J.E., Mise, K., and Furusawa, I.** (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 374-383.
- Talbot, N.J., Kershaw, M.J., Wakley, G.E., De Vries, O., Wessels, J., and Hamer, J.E.** (1996). MPG1 Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 985-999.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., Tomida, T., Maruoka, T., Kasukawa, E., and Saito, H.** (2006). Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J* **25**, 3033-3044.
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., and Saito, H.** (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* **26**, 3521-3533.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J., and van Kan, J.A.** (1998). The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1009-1016.
- Terhune, B.T., and Hoch, H.C.** (1993). Substrate hydrophobicity and adhesion of *Uromyces* urediospores and germlings. *Exp Mycol* **17**, 241-252.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Tong, A.H., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G.D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., Quondam, M., Zucconi, A., Hogue, C.W., Fields, S., Boone, C., and Cesareni, G.** (2002). A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* **295**, 321-324.



- Tonukari, N.J., Scott-Craig, J.S., and Walton, J.D.** (2000). The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* **12**, 237-248.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Tucker, S.L., and Talbot, N.J.** (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 385-417.
- Vadaie, N., Dionne, H., Akajagbor, D.S., Nickerson, S.R., Krysan, D.J., and Cullen, P.J.** (2008). Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *J Cell Biol* **181**, 1073-1081.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R.** (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13804-13809.
- Vranes, M.** (2006). Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Wreschner, D.H., McGuckin, M.A., Williams, S.J., Baruch, A., Yoeli, M., Ziv, R., Okun, L., Zaretsky, J., Smorodinsky, N., Keydar, I., Neophytou, P., Stacey, M., Lin, H.H., and Gordon, S.** (2002). Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Sci* **11**, 698-706.
- Wynn, W.K.** (1976). Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: response to the surface contact stimulus. *Phytopathology* **66**, 136-146.
- Xiao, J.Z., Ohshima, A., Kamakura, T., Ishiyama, T., and Yamaguchi, I.** (1994). Extracellular glycoprotein(s) associated with cellular differentiation in *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 639-644.
- Xu, J.R.** (2000). Map kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet Biol* **31**, 137-152.
- Xu, J.R., and Hamer, J.E.** (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev* **10**, 2696-2706.
- Xue, C., Park, G., Choi, W., Zheng, L., Dean, R.A., and Xu, J.R.** (2002). Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus. *Plant Cell* **14**, 2107-2119.
- Yang, H.Y., Tatebayashi, K., Yamamoto, K., and Saito, H.** (2009). Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *Embo J* **28**, 1380-1391.
- Yee, A.R., and Kronstad, J.W.** (1993). Construction of chimeric alleles with altered specificity at the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 664-668.
- Zarnack, K., Eichhorn, H., Kahmann, R., and Feldbrügge, M.** (2008). Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* **69**, 1041-1053.

- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Nittler, M.P., and Lim, W.A.** (2004). Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol Cell* **14**, 825-832.
- Zhao, X., Mehrabi, R., and Xu, J.R.** (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryot Cell* **6**, 1701-1714.
- Zhao, X., Kim, Y., Park, G., and Xu, J.R.** (2005). A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **17**, 1317-1329.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S., and Xu, J.R.** (2000). The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 724-732.
- Zhou, X.L., Stumpf, M.A., Hoch, H.C., and Kung, C.** (1991). A mechanosensitive channel in whole cells and in membrane patches of the fungus *Uromyces*. *Science* **253**, 1415-1417.

## 6 Anhang



**Abb. 37: Pathogenitätstests diverser *U. maydis* Stämme. (A-D)** Die angegebenen SG200 Derivate wurden in Maispflanzen injiziert und nach zwölf Tagen die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen, wie in Abb. 10 beschrieben, quantifiziert. Die Legende für die verschiedenen Symptome ist unten rechts gezeigt und die Anzahl der infizierten Pflanzen (n) ist über den einzelnen Säulen angegeben.

**Tab. 9: Im Vergleich zu SG200AM1 differentiell regulierte Gene in SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.**

Probe set	um Nummer <sup>1</sup>	Annotation <sup>1</sup> / Name	Sekretiert <sup>2</sup>	Expressions- änderung	$\Delta$ sho1 vs SG200 <sup>3</sup>	$\Delta$ msb2 vs SG200 <sup>4</sup>
C82um028G	um00480	msb2	ja	-116,0	n.s.	-112,3
W25um083G	um03156	sho1	ja	-51,0	-58,7	n.s.
W5um167G	um12258	hypothetical protein	ja	-15,6	-19,0	-14,7
C112um110G	um00558	hypothetical protein	ja	-5,0	-7,8	-5,6
C115um156G	um10418	hypothetical protein	ja	-4,6	-5,2	-4,0
C256um074G	um01779	appressorium marker 1	ja	-3,5	-2,7	n.s.
C80um074G	um01820	hypothetical protein	ja	-3,3	-3,7	-3,3
C35um179G	um01375	pit2	ja	-3,1	-3,3	-3,5
W80um148G	um00792	hypothetical protein	ja	-3,1	-3,3	-2,6
W165um013G	um12233	pectin methylesterase	ja	-3,0	-2,3	n.s.
W65um124G	um01297	hypothetical protein	ja	-3,0	-2,4	n.s.
UG12-12b17- 77h4_RC	um03411	endo-1,4-beta-xylanase	ja	-3,0	n.s.	n.s.
C140um209G	um00029	myo-inositol oxygenase	-	-2,9	n.s.	n.s.
W40um165G	um00441	hypothetical protein	-	-2,7	-2,8	n.s.

<sup>1</sup> <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago><sup>2</sup> <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP><sup>3</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 $\Delta$ sho1 im Vergleich zu SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.<sup>4</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 $\Delta$ msb2 im Vergleich zu SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.

**Tab. 10: Im Vergleich zu SG200AM1 differentiell regulierte Gene in SG200AM1 $\Delta$ sho1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.**

Probe set	um Nummer <sup>1</sup>	Annotation <sup>1</sup> / Name	Sekretiert <sup>2</sup>	Expressions- änderung	$\Delta$ msb2 vs SG200 <sup>3</sup>	$\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 vs SG200 <sup>4</sup>
W25um083G	um03156	sho1	ja	-58,7	n.s.	-51,0
W5um167G	um12258	hypothetical protein	ja	-19,0	-14,7	-15,6
C112um110G	um00558	hypothetical protein	ja	-7,8	-5,6	-5,6
C115um156G	um10418	hypothetical protein	ja	-5,2	-4,0	-4,6
C80um074G	um01820	hypothetical protein	ja	-3,7	-3,3	-3,3
C35um179G	um01375	pit2	ja	-3,3	-3,5	-3,1
W80um148G	um00792	hypothetical protein	ja	-3,3	-2,6	-3,1
C45um236G	um03202	hypothetical protein	ja	-2,8	n.s.	n.s.
W40um165G	um00441	hypothetical protein	-	-2,8	n.s.	-2,7
C256um074G	um01779	appressorium marker 1	ja	-2,7	n.s.	-3,5
W65um124G	um01297	hypothetical protein	ja	-2,4	n.s.	-3,0
W165um013G	um12233	pectin methylesterase	ja	-2,3	n.s.	-3,0

<sup>1</sup> <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago><sup>2</sup> <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP><sup>3</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 $\Delta$ msb2 im Vergleich zu SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.<sup>4</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 im Vergleich zu SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.**Tab. 11: Im Vergleich zu SG200AM1 differentiell regulierte Gene in SG200AM1 $\Delta$ msb2 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.**

Probe set	um Nummer <sup>1</sup>	Annotation <sup>1</sup> / Name	Sekretiert <sup>2</sup>	Expressions- änderung	$\Delta$ sho1 vs SG200 <sup>3</sup>	$\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 vs SG200 <sup>4</sup>
C82um028G	um00480	msb2	ja	-112,3	n.s.	-116,0
W5um167G	um12258	hypothetical protein	ja	-14,7	-19,0	-15,6
C112um110G	um00558	hypothetical protein	ja	-5,6	-7,8	-5,0
C115um156G	um10418	hypothetical protein	ja	-4,0	-5,2	-4,6
C35um179G	um01375	pit2	ja	-3,5	-3,3	-3,1
C80um074G	um01820	hypothetical protein	ja	-3,3	-3,7	-3,3
W80um148G	um00792	hypothetical protein	ja	-2,6	-3,3	-3,1

<sup>1</sup> <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago><sup>2</sup> <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP><sup>3</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 $\Delta$ sho1 im Vergleich zu SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.<sup>4</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 im Vergleich zu SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm.

**Tab. 12: Im Vergleich zu SG200AM1 differentiell regulierte Gene in SG200AM1 $\Delta$ sho1 $\Delta$ msb2 nach 12 h Inkubation auf Parafilm mit 16-Hydroxy-Palmitinsäure (HPS).**

Probe set	um Nummer <sup>1</sup>	Annotation <sup>1</sup> / Name	Sekretiert <sup>2</sup>	Expressions- änderung	Parafilm vs Glas <sup>3</sup>	Parafilm+HPS vs Parafilm <sup>4</sup>
W5um167G	um12258	hypothetical protein	ja	-268,5	15,8	17,0
C82um028G	um00480	msb2	ja	-177,0	n.s.	n.s.
C112um110G	um00558	hypothetical protein	ja	-171,4	3,0	28,1
C35um179G	um01375	pit2	ja	-109,3	n.s.	24,8
W25um083G	um03156	sho1	ja	-82,3	n.s.	n.s.
C115um156G	um10418	hypothetical protein	ja	-72,4	4,4	13,1
W40um179G	um01373.2	vacuolar membrane protein	-	-68,3	3,1	22,4
C45um236G	um03202	hypothetical protein	ja	-64,2	n.s.	18,1
W50um124G	um01300	hypothetical protein	ja	-56,1	n.s.	22,5
C45um124G	um01301	hypothetical protein	ja	-55,2	n.s.	18,9
W35um074G	um01829	alpha-L- arabinofuranosidase	ja	-53,4	n.s.	19,3
C80um074G	um01820	hypothetical protein	ja	-36,0	4,1	14,1
C80um022G	um10030	hypothetical protein	ja	-31,9	n.s.	13,7
C65um086G	um06181	mig2-5	ja	-28,5	n.s.	27,5
W77um035G	um11211	hypothetical protein	ja	-28,2	n.s.	8,9
C55um124G	um01299	hypothetical protein	ja	-27,9	n.s.	16,0
W15um161G	um02523	endoglucanase 1	ja	-25,8	n.s.	17,9
W10um196G	um05097	aspartic protease	ja	-23,6	n.s.	14,5
C36um171G	um00054	hypthetical protein	ja	-19,1	n.s.	7,9
W10um267G	um06126	mig2-6	ja	-15,4	3,0	8,5
W65um066G	um04185	hypothetical protein	ja	-14,0	2,7	10,5
C256um074G	um01779	appressorium marker 1	ja	-13,2	125,6	4,3
C40um236G	um10403	hypothetical protein	ja	-12,6	9,2	8,5
C95um078G	um03294	hypothetical protein	-	-11,3	9,9	5,8
W65um124G	um01297	hypothetical protein	ja	-9,4	13,3	3,7
W41um050G	um01129.2	hypothetical protein	-	-9,1	n.s.	6,2
C260um074G	um01778	hypothetical protein	ja	-8,7	n.s.	6,8
W165um013G	um12233	pectin methylesterase	ja	-8,7	13,9	7,0
C30um189G	um00715	hypothetical protein	ja	-8,6	n.s.	8,0
W80um148G	um00792	hypothetical protein	ja	-7,9	2,6	n.s.
C15um220G	um06315	hypothetical protein	ja	-7,7	2,9	4,3
C65um278G	um12281	hypothetical protein	ja	-7,6	n.s.	9,7
W40um165G	um00441	hypothetical protein	-	-7,3	5,5	3,9
C50um062G	um04928	hdp2	-	-6,0	2,5	3,5

C115um220G	um06293	hypothetical protein	-	-5,8	n.s.	7,5
C155um157G	um02157	hypothetical protein	ja	-5,6	89,9	-3,8
C80um038G	um04160	dkh6	-	-5,4	n.s.	5,6
W125um090G	um00913	glyoxaloxidase	ja	-5,4	45,5	n.s.
W47um236G	um03201	hypothetical protein	ja	-5,4	n.s.	5,6
W155um188G	um04816	endoglucanase 1	ja	-4,7	4,7	5,1
C95um137G	um02599	lysophospholipase	-	-4,5	n.s.	4,2
C115um049G	um00104	hypothetical protein	ja	-4,1	n.s.	4,1
W95um060G	um02111	triacylglycerol lipase	ja	-4,1	19,3	n.s.
W55um073G	um05731	cmu1	ja	-3,9	4,9	n.s.
C140um003G	um01949	hypothetical protein	ja	-3,5	53,3	n.s.
W113um003G	um01957	alpha-1,2-mannosidase	ja	-3,5	59,8	n.s.
C95um098G	um00154	para-nitrobenzyl esterase	ja	-3,4	10,1	n.s.
C91um167G	um04241	hypothetical protein	-	-3,3	3,1	n.s.
W53um185G	um10756	conserved protein	ja	-3,3	n.s.	5,2
C220um074G	um01788	chitin deacetylase	ja	-3,3	3,2	n.s.
W95um021G	um00822	hypothetical protein	ja	-3,2	n.s.	3,4
W25um026G	um02387	oligopeptide transporter	-	-3,2	n.s.	3,2
C60um135G	um01656	sugar transporter	-	-3,0	3,3	n.s.
C72um008G	um04354	hypothetical protein	ja	-3,0	12,2	2,7
W105um030G	um04422	endo-1,4-beta-xylanase	ja	-3,0	n.s.	3,2
W50um185G	um05493	hypothetical protein	-	-3,0	8,0	n.s.
C25um157G	um02185	peptidylprolyl isomerase	-	-2,9	n.s.	n.s.
C37um165G	um00442	hypothetical protein	-	-2,7	n.s.	n.s.
W55um091G	um02423	hypothetical protein	-	-2,6	n.s.	2,6
C60um070G	um02475	stp1	ja	-2,5	n.s.	2,6
W17um212G	um04601	hypothetical protein	ja	-2,4	n.s.	17,0
C50um286G	um00522	hypothetical protein	-	-2,4	5,2	28,1

<sup>1</sup> <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>

<sup>2</sup> <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP>

<sup>3</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm im Vergleich zu 2 h Inkubation auf Glas (P. Berndt, D. Lanver und R. Kahmann, nicht publiziert).

<sup>4</sup> Expressionsänderung in SG200AM1 nach 12 h Inkubation auf Parafilm mit HPS im Vergleich zu 12 h Inkubation auf Parafilm (P. Berndt, D. Lanver und R. Kahmann, nicht publiziert).

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Regine Kahmann, für die Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu dürfen, bedanken. Besonders danke ich ihr für die stete Unterstützung jeglicher Art, das Einbringen vieler Ideen, aber auch für die Freiheiten, die ich während der Durchführung dieser Arbeit hatte.

Für viele spannende Diskussionen und die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich Michael Bölker meinen Dank aussprechen. Ebenso möchte ich an dieser Stelle Uwe Maier und Erhard Bremer für ihre Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören herzlich danken.

Für die Finanzierung dieser Arbeit und eine sehr lehrreiche Zeit bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Graduiertenkolleg 1216.

Für eine gute Kooperation bedanke ich mich bei Alfonso Fernández-Álvarez und José I. Ibeas von der Universität Pablo de Olavide in Sevilla. Weiterhin gilt mein Dank Elena Pérez-Nadales und Antonio Di Pietro von der Universität Córdoba für den stetigen Austausch nicht publizierter Daten. Ferner bedanke ich mich bei Paul Cullen von der Universität Buffalo für einen überaus informativen Gedankenaustausch.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern und Ehemaligen der Abteilung für organismische Interaktionen sowie der Arbeitsgruppe von Michael Bölker an der Philipps-Universität für das Bereitstellen von Materialien, die Diskussionsbereitschaft und die positive Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere danke ich Patrick Berndt, nicht nur für die experimentelle Beteiligung an dieser Arbeit, sondern auch für eine schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Weiterhin bedanke ich mich bei Armin Djamei, Stefanie Reißmann, Kerstin Schipper und Gunther Döhlemann, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Für experimentelle Unterstützung danke ich zudem Xiajuan Xia.

Für die permanente Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen sowie für ihre Freundschaft möchte ich mich bei Johannes Freitag und Sebastian Baumann bedanken.

Natürlich danke ich all meinen Freunden, insbesondere jedoch meinen Eltern, meiner Oma und meinem Bruder, die mir in den letzten Jahren zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meiner Ehefrau Daniela, die mir mit ihrer Liebe und ihrer wundervollen Art immer wieder neue Kraft gegeben hat.